



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FÍSICA Y ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON
RADIACIÓN UV PARA LA ELIMINACIÓN DE
RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ACEITE DE
OLIVA VIRGEN**

**PRESENTADA POR:
VELIA MARUXIE YUFRA PICARDO**

**DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. NATIVIDAD RAMOS MARTOS
DR. D. JUAN FRANCISCO GARCÍA REYES**

JAÉN, 10 DE JULIO DE 2013

ISBN 978-84-8439-393-1

*EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN UV
PARA LA ELIMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS
EN ACEITE DE OLIVA VÍRGEN*

Los Directores,

Fdo. Dra. Natividad Ramos Martos
(Profesora Titular Universidad de Jaén)

Fdo. Dr. Juan Francisco García Reyes
(Profesor Titular Universidad de Jaén)

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca para estudios de postgrado del Programa de Ciencia y Tecnología - Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT) del Gobierno Peruano (CIES- 2009), y la financiación obtenida en el marco del Proyecto de Investigación de Excelencia AGR - 6182 titulado “DESARROLLO Y APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ACEITE DE OLIVA” financiado por la Junta de Andalucía, dentro de una de las líneas de investigación desarrolladas por el Grupo de Investigación “Química Analítica de la Universidad de Jaén” (Grupo FQM 323 del Plan Andaluz de Investigación (PAI)), que está centrada en la caracterización química de aceites vegetales y productos derivados para propósitos alimentarios y tecnológico/industrial.

A mis hijas y compañero

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profunda admiración y gratitud a mis directores, los Dres. Natividad Ramos Martos y Juan Francisco García Reyes por guiarme durante este proceso, demostrándome su paciencia y su amistad.

A mi esposo, por ayudarme a desarrollar este don de madre y a mis hijas por la paciencia que han demostrado en las horas de ausencia, por la que me siento orgullosa y afortunada por tener vuestro apoyo incondicional, sin su compañía durante estos años no hubiera terminado la realización de este trabajo.

A mis padres, por darme las fuerzas para seguir adelante, pese a las adversidades; a mis hermanos, por suplir mi ausencia.

Al Dr. Antonio Molina Díaz, por haber confiado en mí desde el principio y haber puesto a mi disposición todos los recursos necesarios para la realización de esta tesis y ser mi Tutor.

También quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén, en especial al Grupo de Investigación FQM 323 que han contribuido a la realización de este trabajo, ya sea en el laboratorio o fuera del mismo. En particular, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Juan Carlos Domínguez Romero, sin su apoyo y amistad, hubiese sido mucho más difícil para mí llegar a escribir estas líneas. Gracias también a José, Felipe, Patricia, Bienvenida y Zanhy.

Un agradecimiento a la Junta de Andalucía por el proyecto de Investigación AGR-6182, “Desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para la detección y eliminación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva”.

Este trabajo ha sido posible gracias al Financiamiento para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT – Perú) de la Presidencia de Consejo de Ministros, a través de una beca doctoral.

Por último, quisiera expresar mi gratitud al Dr. Rafael Pacheco Reyes por el tiempo que dedicó antes y durante mi estancia en Jaén.

"Cuando realmente quieres que algo suceda, el universo entero conspira para que tu deseo se vuelva realidad"

Paulo Coelho

Índice



RESUMEN	1
1. OBJETIVOS	5
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. El olivar en el mundo	7
2.1.1. Olivar en la actualidad	9
2.1.2. Situación internacional del aceite de oliva	10
2.1.3. Superficie cultivada de olivares	11
2.1.4. El aceite de oliva y la dieta mediterránea	13
2.2. Variedades de aceituna	16
2.3. Normas de calidad para los diferentes tipos de aceite de oliva	21
2.3.1. Criterios de calidad	22
2.3.2. Criterios de pureza	28
2.3.3. Denominaciones comerciales del aceite de oliva	28
2.3.4. Análisis organoléptico	32
2.4. Composición química del aceite de oliva	39
2.4.1. Fracción saponificable	39
2.4.1.1. Ácidos grasos	40
2.4.2. Fracción insaponificable	42
2.4.2.1. Compuestos fenólicos	43
2.4.2.2. Clorofilas y otros pigmentos	51
2.4.2.3. Tocoferoles	53
2.4.2.4. Compuestos triterpénicos	55
2.4.2.5. Alcoholes alifáticos	56
2.4.2.6. Esteroles	57
2.4.2.7. Componentes volátiles	58
2.5. Contaminantes del aceite de oliva	64
2.5.1. Plaguicidas	64
2.5.2. Residuos de hidrocarburos aromáticos monocíclicos	65
2.5.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	65
2.5.4. Metales	69
2.6. Plaguicidas	70
2.6.1. Insecticidas y acaricidas	72
2.6.1.1. Carbámicos	72
2.6.1.2. Organofosforados	73
2.6.1.3. Piretroides	75
2.6.2. Fungicidas	76
2.6.3. Herbicidas	77
2.6.3.1. Triazoles	77
2.6.3.2. 1,3,5-Triazinas	78

2.6.3.3. Dinitroanilinas	79
2.6.3.4. Ureas sustituidas	80
2.7. Riesgos de la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos	81
2.8. Medida de la toxicidad de un plaguicida	83
2.9. Normativa para plaguicidas en aceituna y aceite de oliva	84
2.10. Plaguicidas empleados en el olivar	87
2.11. Producción Integrada	89
2.11.1. Reglamento específico de producción integrada del olivar	91
2.11.2. Reglamento específico de producción integrada para industrias de elaboración de aceite de oliva	92
2.12. Aceite de oliva ecológico	92
2.13. Métodos de análisis para la determinación de plaguicidas y contaminantes	94
2.13.1. Métodos de extracción de plaguicidas y contaminantes	94
2.13.1.1. Extracción líquido-líquido	95
2.13.1.2. Extracción en fase sólida	96
2.13.1.3. Método QuEChERS	98
2.13.1.4. Microextracción en fase sólida	99
2.13.1.5. Cromatografía de permeación en gel	102
2.13.2. Determinación analítica de plaguicidas y contaminantes	103
2.13.2.1. Cromatografía de líquidos	104
2.13.2.2. Cromatografía de gases	106
2.13.2.3. Espectrometría de masas como detector	107
2.13.2.4. Cromatografía de líquidos / espectrometría de masas	125
2.13.2.5. Cromatografía de gases / espectrometría de masas	126
3. ANTECEDENTES	129
3.1. Tecnologías para la degradación de contaminantes químicos en alimentos	129
3.1.1. Campos eléctricos pulsados de alta intensidad	129
3.1.2. Sonoquímica o ultrasonido	130
3.1.3. Ozonización	132
3.1.4. Combinación de ozonización y ultrasonido	134
3.1.5. Radiación ultravioleta	135
3.2. Monitoreo de plaguicidas en aceite de oliva	142
3.2.1. Metodología para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva	159
3.3. Degradación de plaguicidas	148
3.3.1. Tipos de reacción y cinética de degradación de plaguicidas	148
3.3.2. Comportamiento medioambiental de los plaguicidas	168
3.4. Degradación de plaguicidas en aceite de oliva	155
4. INSTRUMENTACIÓN	159

4.1. HPLC-TOFMS	159
4.2. GC-MS/MS	161
4.3. Equipo para radiación ultravioleta	162
4.4. Otros equipos utilizados	163
 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
 5.1. Monitoreo de los residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos en aceite de oliva virgen de diferentes zonas de producción mundial	
Resumen	165
5.1.1. Introducción	167
5.1.2. Experimental	170
5.1.2.1. Muestras analizadas	170
5.1.2.2. Tratamiento de muestra: extracción líquido-líquido	172
5.1.2.3. Cromatografía de gases – espectrometría de masas	174
5.1.2.4. Cromatografía de líquidos – espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo.	175
5.1.2.5. Desarrollo de la base de datos.	176
5.1.3. Resultados y discusión	179
5.1.3.1. Optimización de la separación cromatográfica	179
5.1.3.2. Parámetros analíticos	185
5.1.3.3. Análisis de muestras reales	192
5.1.4. Conclusiones	201
5.1.5. Anexo (material suplementario)	202
 5.2. Estudio de la degradación de plaguicidas empleados en el olivar mediante radiación ultravioleta e identificación de los principales productos de degradación en disoluciones acuosas y aceite de oliva virgen	
Resumen	209
5.2.1. Introducción	211
5.2.2. Experimental	214
5.2.2.1. Patrones	214
5.2.2.2. Equipo para radiación ultravioleta	216
5.2.2.3. Cromatografía gases – espectrometría de masas	217
5.2.2.4. Cromatografía de líquidos – espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo	218
5.2.2.5. Degradación de plaguicidas en disoluciones acuosas mediante radiación ultravioleta	219

5.2.2.6. Degradación de plaguicidas en aceite de oliva mediante radiación ultravioleta.....	222
5.2.2.7. Predicción de toxicidad	225
5.2.3. Resultados y discusión.....	226
5.2.3.1. Optimización de la separación cromatográfica	226
5.2.3.2. Estudio de degradación de los plaguicidas en disoluciones acuosas	230
5.2.3.3. Comportamiento cinético de los plaguicidas en disoluciones acuosas	234
5.2.3.4. Identificación de productos de degradación en disoluciones acuosas	237
5.2.3.5. Predicción de la toxicidad de los plaguicidas y sus productos de degradación.....	257
5.2.3.6. Identificación de plaguicidas en aceite de oliva virgen	261
5.2.3.7. Comportamiento y estudio de degradación de los plaguicidas en aceite de oliva virgen	263
5.2.3.8. Estudio de la cinética de los plaguicidas estudiados	265
5.2.3.9. Estudio de los productos de degradación de los plaguicidas en aceite de oliva virgen	269
5.2.3.10. Comportamiento de los productos de degradación de los plaguicidas en estudio en aceite de oliva	274
5.2.3.11. Estudio comparativo de la degradación de plaguicidas en aceite de oliva	275
5.2.4. Conclusiones.....	277
5.3. Evaluación del tratamiento con radiación ultravioleta de triazinas en disoluciones acuosas y aceite de oliva virgen extra	279
Resumen	279
5.3.1. Introducción	281
5.3.2. Experimental	283
5.3.2.1. Patrones.....	283
5.3.2.2. Equipo para radiación ultravioleta	284
5.3.2.3. Extracción en fase sólida para el análisis de disoluciones acuosas	285
5.3.2.4. Estudio de degradación de las triazinas de partida en soluciones acuosas	286
5.3.2.5. Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo	287
5.3.2.6. Estudio del comportamiento de triazinas en aceite de oliva virgen	288
5.3.2.7. Predicción de toxicidad	290
5.3.3. Resultados y discusión.....	292
5.3.3.1. Identificación de las triazinas en disoluciones acuosas	292

5.3.3.2.	Estudio de degradación de triazinas en disoluciones acuosas.....	297
5.3.3.3.	Comportamiento cinético de las triazinas en disoluciones acuosas ..	299
5.3.3.4.	Identificación de productos de degradación de las triazinas en disoluciones acuosas	300
5.3.3.5.	Formación y degradación de los productos de degradación de las triazinas en disoluciones acuosas	316
5.3.3.6.	Predicción de la toxicidad de las triazinas y sus productos de degradación.....	344
5.3.3.7.	Identificación de triazinas en aceite de oliva.....	347
5.3.3.8.	Comportamiento y estudio de degradación de las triazinas en aceite de oliva.....	347
5.3.3.9.	Estudio de la degradación de triazinas en aceite	349
5.3.3.10.	Estudio de los productos de degradación de las triazinas en aceite de oliva virgen	351
5.3.3.11.	Comportamiento de los productos de degradación de las triazinas en aceite de oliva.....	359
5.3.3.12.	Estudio comparativo de la degradación de las triazinas en aceite de oliva	360
5.3.4.	Conclusiones.....	362
5.3.5.	Referencias bibliográficas	390
5.4.	Estudio del tratamiento con radiación UV en la composición del aceite de oliva de distintas categorías comerciales: evaluación de los principales parámetros de calidad y componentes minoritarios	
Resumen		363
5.4.1.	Introducción	365
5.4.2.	Experimental	367
5.4.2.1.	Equipo para radiación ultravioleta	367
5.4.2.2.	Determinación de parámetros de calidad de aceite de oliva	368
A)	Grado de acidez	368
B)	Índice de peróxidos.....	369
C)	Absorbancia en el UV (K_{232} y K_{270}).....	370
5.4.2.3.	Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.....	371
5.4.2.4.	Determinación del contenido en compuestos fenólicos.....	373
A)	Determinación de polifenoles totales	373
B)	Perfilado (individual) de polifenoles mediante cromatografía de líquidos	374
5.4.2.5.	Determinación de tocoferoles.....	379
5.4.2.6.	Pigmentos clorofílicos y carotenoides	380
5.4.2.7.	Determinación de compuestos volátiles	381
5.4.2.8.	Análisis sensorial.....	383

5.4.3. Resultados y discusión	385
5.4.3.1. Evolución de los parámetros de calidad de aceites de oliva con el tratamiento ultravioleta	385
5.4.3.2. Evolución del contenido de ácidos grasos frente al tratamiento con radiación ultravioleta	390
5.4.3.3. Estudio del comportamiento compuestos fenólicos en el aceite de oliva sometidos a la exposición de la luz ultravioleta.....	391
A) Determinación de polifenoles totales	392
B) Perfilado de polifenoles en aceite de oliva virgen frente al tratamiento con radiación ultravioleta	393
5.4.3.4. Estudio del comportamiento de los tocoferoles presentes en el aceite de oliva sometidos a la exposición de la luz ultravioleta	398
5.4.3.5. Estudio de los pigmentos clorofilicos y carotenoides en los aceites de oliva.....	400
5.4.3.6. Estudio del comportamiento de los compuestos volátiles en el aceite de oliva sometidos a la exposición de la luz ultravioleta	404
5.4.3.7. Prueba del análisis sensorial a las muestras sometidas a la exposición de la luz ultravioleta	409
5.4.4. Conclusiones	412
6. CONCLUSIONES	415
7. BIBLIOGRAFIA	417
8. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS	451

*R*ESUMEN



RESUMEN

El uso de productos fitosanitarios es una herramienta empleada para mejorar, optimizar el rendimiento y las cosechas en el olivar en las regiones productoras. Los aceites de oliva pueden contaminarse también por los sistemas de recolección y sistemas de aguas de lavado en la extracción. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar la potencialidad del empleo del tratamiento con radiación ultravioleta para la eliminación de residuos de plaguicidas que se pueden encontrar en el aceite de oliva, así como investigar el posible efecto de la radiación sobre la composición química del aceite, incluyendo los principales parámetros de calidad del aceite de oliva, otros componentes mayoritarios como los ácidos grasos y otros minoritarios de elevado valor añadido, como son polifenoles, tocoferoles y volátiles. La Tesis Doctoral está dividida en tres bloques principales de experimentos:

- El estudio de niveles de plaguicidas en muestras de aceite de oliva virgen
- El estudio de la degradación de los plaguicidas empleados en el olivar empleando radiación UV
- El estudio de la influencia de la radiación UV sobre la composición química y principales parámetros de calidad del aceite de oliva virgen

En el primer bloque (Capítulo 5.1), se ha realizado un estudio de los niveles de residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos llevado a cabo en 56 muestras de aceite de oliva de 10 países productores con el fin de obtener una visión global de los compuestos y niveles de concentración esperables. Se emplearon metodologías analíticas multi-residuo basadas en cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) y; cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo. De un total de más de 400 contaminantes orgánicos estudiados, se identificaron 10 plaguicidas que fueron

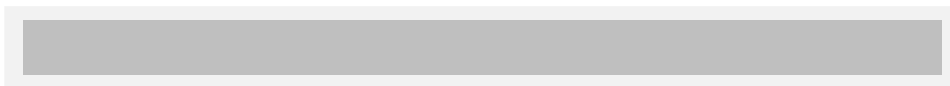
detectados en la mayoría de las muestras en un rango de concentración 0.001 – 0.209 mg/Kg.

En el segundo bloque de experimentos, (Capítulos 5.2. y 5.3), se ha estudiado el comportamiento y degradación a través del tratamiento con radiación UV de 49 plaguicidas (39 plaguicidas de diferentes familias y 10 triazinas), empleados en el olivar, llevándose a cabo estudios tanto en aceite de oliva virgen como en disolución acuosa. En algunos casos, la eliminación de los plaguicidas mediante radiación UV trae consigo la formación de otros productos de degradación, identificando más de 140 productos de degradación en los experimentos en disoluciones acuosas. Algunos de ellos han sido propuestos por primera vez en el presente trabajo. Además se estimó la toxicidad de los principales productos de degradación.

En el tercer bloque (Capítulo 5.4.) se ha estudiado el efecto del tratamiento con radiación UV sobre la composición del aceite de oliva de diferentes categorías comerciales, basado en el estudio de la evolución de los principales parámetros de calidad (acidez, índice de peróxidos, y K_{232} y K_{270}) y otros indicadores como el perfil de los ácidos grasos, el contenido individual y total de polifenoles, el contenido de tocoferoles, de pigmentos (clorofilas y carotenos), el contenido en compuestos volátiles y una prueba de análisis sensorial mediante panel de cata. Los principales parámetros de calidad no se ven afectados sustancialmente por el tratamiento UV. En la composición del aceite de oliva virgen extra, sí que se observan algunos cambios de relevancia, como en el perfil de ácidos grasos sin alteraciones significativas, el contenido de polifenoles y de tocoferoles se degradan 60% y 35% respectivamente. Los pigmentos fotosintéticos tuvieron un descenso 84.38%, así como la formación y degradación de carotenoides. El contenido en volátiles y el análisis sensorial, se percibió por el panel de cata un defecto sensorial de rancidez, siendo un atributo negativo para los aceites de oliva. A partir de los resultados obtenidos y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite de oliva podemos decir que la exposición de la luz ultravioleta (150 minutos) permite la degradación mayoritaria de los plaguicidas

estudiados, mientras que no afecta significativamente los parámetros clásicos de calidad del aceite de oliva ni a la composición de éste, salvo en el caso de los componentes volátiles y los tocoferoles. Esto repercute en los análisis sensoriales que reflejan la aparición de defectos que hacen que la categoría comercial (aceite de oliva virgen extra) no perdure después de un tratamiento con radiación UV completo. Por tanto, la tecnología desarrollada se puede considerar útil para el propósito de eliminar plaguicidas, pero enfocada como una etapa de refinado para la obtención de aceites de oliva refinados comerciales. La presente metodología podría ser ensayada en otros aceites vegetales comestibles más empleados que el aceite de oliva.

1. OBJETIVOS



1. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar la potencialidad del empleo del tratamiento con radiación ultravioleta para la degradación de los principales plaguicidas que se pueden encontrar en el aceite de oliva, así como investigar el posible efecto de la radiación sobre la composición química del aceite, incluyendo los principales parámetros de calidad del aceite de oliva, así como el efecto sobre otros componentes esenciales como los ácidos grasos y otros compuestos minoritarios del aceite de oliva de elevado valor añadido, como son polifenoles y tocoferoles.

Para alcanzar el objetivo general antes citado, se plantean a continuación los siguientes objetivos parciales:

1. Identificar los principales plaguicidas que suelen estar presentes en el aceite de oliva a través de un estudio detallado del contenido de plaguicidas en aceites procedentes de diferentes regiones productoras a nivel mundial.
2. Estudiar el comportamiento y la degradación de plaguicidas empleados en el olivar en matrices acuosas y aceite de oliva, al someterse a tratamiento con radiación ultravioleta, identificando los principales productos de degradación generados y su potencial toxicidad, así como la efectividad del tratamiento UV para la eliminación de dichos plaguicidas.
3. Estudiar los parámetros globales de calidad de los aceites tratados y evaluar el efecto de la radiación ultravioleta sobre éstos parámetros que sirven para clasificar el aceite de oliva en sus distintas categorías comerciales.

2. *INTRODUCCIÓN*



2. INTRODUCCIÓN

2.1. El olivar en el mundo

El olivo silvestre (*Olea europea sativa*), es un árbol común en el cercano oriente y en el entorno mediterráneo. El olivo y las culturas occidentales originarias dibujan el mismo mapa geográfico. No se ha establecido con claridad dónde comenzó a cultivarse, tal vez porque simultáneamente se hizo en varias regiones donde la vida sedentaria asentó la cultura agrícola y con ella sus tres pilares principales: los cereales, el olivo y la vid [1].

El olivo, originario de una región geográfica que ocupa desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Palestina y la zona costera de Siria, se extendió por Chipre hacia Anatolia, y a través de Creta hacia Egipto, hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo. A partir del siglo XV, con los viajes oceánicos de Colón, Magallanes y Juan Sebastián Elcano, se extendió por el nuevo continente (América) y, en la actualidad, se cultiva también en Sudáfrica, China, Japón y Australia [2].

Si su cultivo comenzó en la antigua Persia o si fue iniciada por asirios o si las primeras olivas crecieron en Palestina [3], es algo que puede considerarse secundario; lo importante es que se encuentra en los orígenes de las culturas fenicias, asirias, judías, egipcias, griegas y otras muchas menos documentadas de la geografía mediterránea. En este sentido, cabe hablar de simultaneidad.

Las primeras referencias documentadas del cultivo del olivo se encuentran en las regiones orientales de la actual Siria e Irán, cuya antigüedad se remonta a 4000 años antes de la actual era [4]. Lo más probable es que los fenicios jugaran un papel determinante en su expansión a través de las islas del Mediterráneo oriental como Creta o el extremo occidental en la actual Península Ibérica.

Podríamos remontarnos setenta siglos antes de Cristo, cuando a orillas del Tigris y el Eufrates comienzan a desarrollarse los primeros albores de la historia del olivo; en la Baja Mesopotamia aparecen alrededor de 4.000 a.C. [5]. Los asirios influyeron grandemente sobre los cananeos, antecesores de los hebreos en Palestina y de los fenicios en Fenicia, legándoles gran parte de sus conocimientos, entre ellos el cultivo del Olivo tan arraigado desde los tiempos bíblicos en Palestina y el Líbano [3]. Ya en la edad antigua se conocían dos tratados importantes referidos a la agricultura, uno de ellos fue escrito por el célebre Virgilio, llamado "Las Geórgicas" el cual se refería a las cosechas, los cuidados de los frutales, el Olivo, y la Vid, la cría de los ganados y la Apicultura. Este tratado fue escrito alrededor de los años 29 – 39 a. C. El segundo tratado es mucho más antiguo, fue escrito por el poeta griego, Hesiodo, en el siglo VIII a.C. al cual tituló "Los Trabajos y los Días ", donde describe minuciosamente las tareas que se deben realizar en un olivar.

Los testimonios de la presencia del olivo en España, se remontan al periodo Neolítico (8000-2700 a. C.), corresponden a fragmentos de madera carbonizada hallados en las proximidades de Alicante [6], así como a huesos de aceituna encontrados en El Garcel (Almería) por el ingeniero de minas belga Luis Siret a finales de siglo XIX, que datan del Neolítico tardío y principios de la Edad del Cobre, entre los años 3000 - 2500 a. C. También se han encontrado restos relacionados con el olivo en las cuevas de Nerja (Málaga) aunque su datación se aproxima al año 3800 a. C. El pequeño tamaño del hueso de la aceituna, sugiere que los árboles que se cultivaban eran más parecidos al olivo silvestre que al olivo actual. También se remonta al neolítico la presencia del olivo en Puglia, mientras que la presencia del olivo en el lago de Garda, se remonta a la Edad del Bronce (1500-1000 a. C.) [7].

2.1.1. Olivar en la actualidad

Según datos del Consejo Oleícola Internacional (COI), el cultivo del olivar a nivel mundial está constituido por unos 850 millones de árboles que ocupan una superficie de más de 10 millones de hectáreas. De éstas, más de un millón se dedica a la producción de aceitunas de mesa. La producción total de aceitunas asciende a más de 18 millones de toneladas anuales, de las cuales el 90% se destinan a la producción de aceite y el 10% restante a la producción de aceituna de mesa.

Según la encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos de 2011 [8], España cuenta con 2.584.564 hectáreas de olivar, de las que 123.479 (4,79%) se dedican a la aceituna de mesa, lo restante al aceite. Éstas últimas se concentran principalmente en Andalucía y Extremadura, que cuentan con un 82,6% y un 16,55% del total respectivamente.

España es el primer país productor de aceitunas de mesa y aceite de oliva del mundo, seguido a mucha distancia de otros países de la cuenca mediterránea, como Italia, Portugal y Grecia. La producción media mundial de las últimas cinco campañas asciende a 1.750.000 toneladas, de las cuales 526.000 se produjeron en España, es decir, un 30% del total. Otros países productores son Turquía, Egipto, Argentina, Siria, Australia, China, Chile, Túnez, entre otros.

La variedad Picual, constituye la variedad más extendida no sólo en España, sino también en el mundo, representando el 20% del olivar mundial. Se calcula que en España alcanza el 50%, siendo la zona de Andalucía donde alcanza mayor cultivo. Es mayoritaria en la provincia de Jaén y en las Denominaciones de Origen "Sierra de Segura", "Baena", "Priego de Córdoba", y "Sierra Mágina". Una característica muy importante de los olivos picuales es su alta productividad. Esto ha influido en la intensificación de sus plantaciones. Además, el olivar se adapta perfectamente a diversas condiciones de clima y suelo siendo tolerante a las heladas. Los únicos

factores perjudiciales para esta variedad son las sequías y los terrenos muy calizos. La variedad Picual tiene un rendimiento graso elevado que puede alcanzar el 25%, un elevado índice de estabilidad (por su alto contenido en polifenoles y otros antioxidantes de origen natural como los tocoferoles) y un alto contenido de ácido graso monoinsaturado como es el ácido oleico.

2.1.2. Situación internacional del aceite de oliva

Los principales países consumidores son igualmente los principales países productores como muestra la Figura 2.1. Los países de la Unión Europea (UE) constituyen el 93.5% y los países de la cuenca mediterránea suponen el 59% del consumo mundial, respectivamente. El resto de principales países consumidores son Estados Unidos, Siria, Turquía y Marruecos, según el COI.

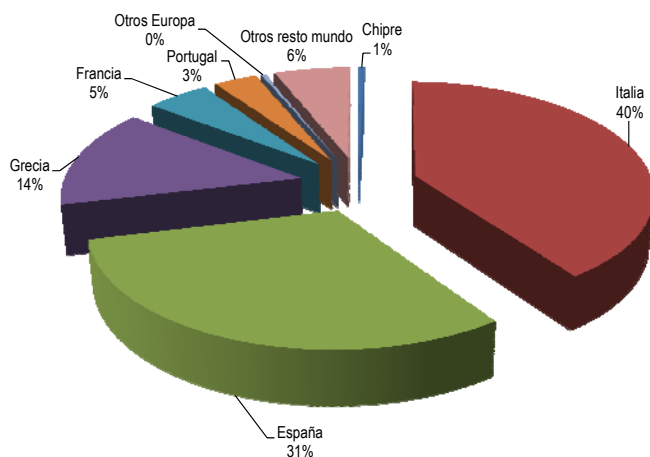


Figura 2.1. Principales países consumidores de aceite de oliva (2011/12) [9].

2.1.3. Superficie cultivada de olivares

EL hábitat del olivo se concentra entre las latitudes 30° y 45°, tanto en el hemisferio norte como en el sur, en regiones climáticas de tipo Mediterráneo, caracterizadas por un verano seco y caluroso. En el hemisferio sur, el olivar está presente en latitudes más tropicales con clima modificado por la altitud [2].

La superficie mundial plantada (ver Figura 2.2) se divide en los dos hemisferios, representados por las franjas de color verde. Estas son zonas donde las condiciones edafoclimáticas permiten la producción de aceitunas, materia prima para la elaboración de aceite de oliva. A su vez los puntos verdes representan la localización de las mayores plantaciones a nivel mundial, los puntos amarillos y rojos los de menores escalas.

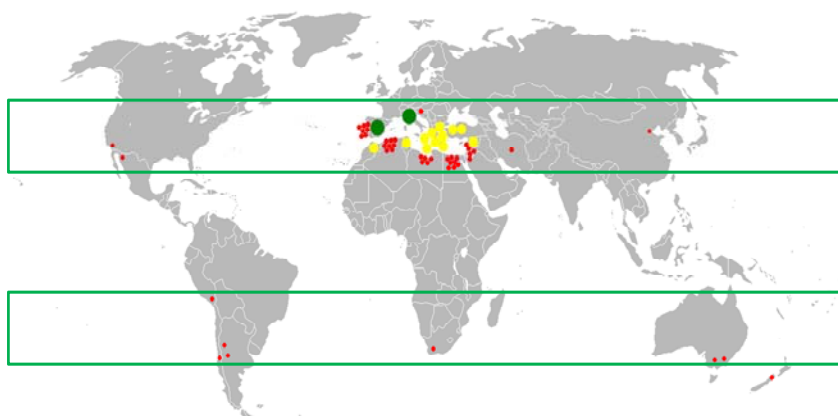


Figura 2.2. Producción olivarera mundial: localización mayores plantaciones mundiales (puntos verdes), en menor escala (puntos amarillos y rojos).

De los 27 países productores de aceite de oliva a nivel mundial, tal como se observa en la Tabla 2.1., en el hemisferio norte destacan los países de la UE con el 75% de la producción mundial y sólo España, Italia y Grecia representan el 72% del total europeo.

En los últimos 10 años la producción mundial ha aumentado en un 21%, aunque la producción de los países emergentes es aún escasa en el contexto mundial, como es Argentina, Australia, China, Chile y Perú, que representan menos del 2% del total mundial y sólo el 22% de los productores se encuentra en el hemisferio sur. Ello deja a los países del hemisferio sur con alto potencial de crecimiento a fin de aprovechar la contra estacionalidad provocada en la producción de aceitunas, respecto al stock de aceite de los mayores productores mundiales.

Tabla 2.1. Países productores de aceite de oliva a nivel mundial.

Países productores	
Hemisferio Norte	Albania, Argelia, Chipre, Croacia, Egipto, Eslovenia, España, Francia, Grecia, Irán, Israel, Italia, Jordania, Libia, Malta, México, Marruecos, Serbia y Montenegro, Siria, Túnez y Turquía.
Hemisferio Sur	Argentina, Australia, Chile, Nueva Zelanda, Perú, Sudáfrica y Uruguay

En los últimos diez años, la producción española de aceite de oliva ha crecido fuertemente (por encima del millón de toneladas), superando con creces los cupos de producción asignados por la UE. Sin embargo, el consumo interior ha crecido mucho más lentamente, al tratarse de un sector maduro y muy influido por la evolución de los precios.

España es el primer productor y exportador mundial de aceite de oliva, un producto que destaca además sobre los demás por su alta calidad y el elevado potencial tecnológico y de abastecimiento, tal como se observa en la Figura 2.3, produce el 49% de la producción mundial.

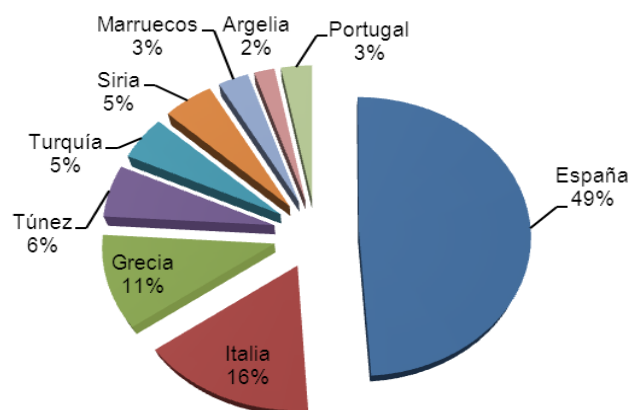


Figura 2.3. Producción mundial de aceite de oliva (2011/2012) [9].

2.1.4. El aceite de oliva y la dieta mediterránea

La civilización mediterránea es considerada como la portadora de una visión global del hombre. Esta civilización, heredera de las filosofías griegas y romanas es la civilización del aceite de oliva. Junto a la civilización grecorromana, las culturas árabe y judía han dejado también sus huellas en las tierras hispánicas. Todas estas culturas daban gran importancia al aceite de oliva [10].

A partir de la Segunda Guerra Mundial, se observó un aumento de la incidencia de las enfermedades cardiovasculares en Estados Unidos y Gran Bretaña. A partir de estudios realizados en los años 60 [11], sobre la incidencia de distintas enfermedades en distintas culturas, se observa que en los países mediterráneos (Yugoslavia, Grecia, Italia) se alcanza una esperanza de vida mayor y una menor incidencia en enfermedades del corazón y de algún tipo de cáncer.

En el mundo, existen diversos modelos de alimentación: el norteamericano, el noreuropeo, el asiático, el mediterráneo, etc. Se denomina dieta mediterránea (o mejor alimentación mediterránea), *“al modelo de alimentación típico de las regiones costeras*

del mar Mediterráneo" (aunque existen marcadas diferencias entre sus patrones de alimentación).

Se ha comprobado por medio de estudios científicos que existe una fuerte correlación entre el consumo de grasa y el desarrollo de ciertas enfermedades [12], como la arterosclerosis, cuya principal complicación es el infarto de miocardio, responsable de la mitad de las muertes de varones adultos en Estados Unidos. Al mismo tiempo, se ha demostrado que existe una estrecha relación con los niveles de colesterol total en el plasma.

En enero de 1993, expertos mundiales en dieta, nutrición y salud se reúnen para desarrollar una guía alimentaria, en forma de pirámide, que refleja la tradición alimentaria mediterránea como un modelo beneficioso para la salud. En 1994, Oldways diseña la Pirámide de la dieta mediterránea, que se muestra en en la Figura 2.4.

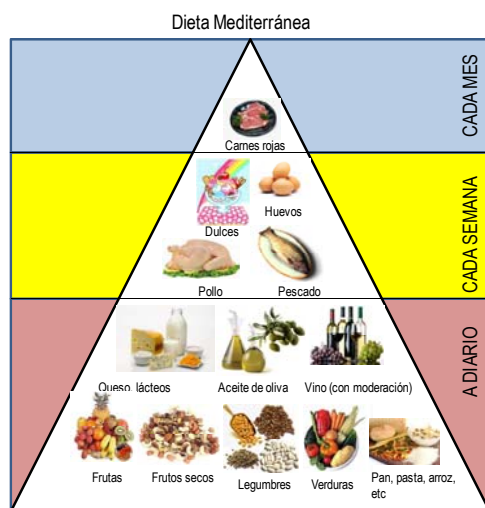


Figura 2.4. Pirámide de la Dieta Mediterránea de Oldways.

El COI ha propiciado la celebración de congresos y coloquios para determinar y divulgar el valor nutritivo y terapéutico del aceite de oliva [9, 13], así también la

realización de Congresos Internacionales sobre Aceite de Oliva y Salud [14, 15]. La dieta mediterránea ayuda a prevenir cardiopatías y acumulaciones nocivas de colesterol. La nutrición de los pueblos del Sur de Europa es más rica en grasa vegetal que en grasa animal.

La dieta mediterránea se caracteriza por:

- Abundancia de productos vegetales (frutas y verduras) mínimamente procesados, frescos y estacionales.
- Fruta fresca en el postre
- Aceite de oliva como fuente de grasas
- Pequeñas cantidades diarias de productos lácteos
- Consumo moderado de pescado y pollo
- Hasta cuatro huevos semanales
- Pequeñas cantidades de carne roja
- Pastas, arroz y sopas
- Frutos secos
- Cantidades moderadas de vino con las comidas

El aceite de oliva es un alimento de elevado valor calórico puesto que sus componentes son lípidos (grasas). Un 10% son ácidos saturados, como la grasa animal, un 80% son ácidos monoinsaturados (el ácido oleico) y el restante 10%, ácidos poliinsaturados. El aceite de oliva es también rico en:

- Vitamina E es muy importante contra la esterilidad humana contiene de 10 a 13 mg por cada 100 centímetros cúbicos.
- Los ácidos grasos esenciales como el linolénico o el linoleico, tiene gran influencia en los trastornos dermatológicos, del crecimiento y del desarrollo sexual.
- La vitamina K tiene una importancia antihemorrágica.

- Aunque en pequeñas dosis, el aceite de oliva contiene provitamina A: los betacarotenos (colorantes) forman la vitamina A, dentro del organismo humano, de gran importancia en ciertos problemas de la visión.

Los antioxidantes (polifenoles) actúan como protectores frente a los radicales libres, responsables de la degeneración celular.

Existen dos tipos de lipoproteínas, las denominadas colesterol de baja densidad (LDL, *low density lipoproteins*), aterógeno o malo que transporta un 60% de colesterol total del plasma humano) y las denominadas colesterol de alta densidad (HDL, *high density lipoprotein*), protector o bueno que contiene un 25% de colesterol), encargadas de trasvasar el colesterol de los tejidos a la sangre para su eliminación posterior.

El aceite de oliva reduce el colesterol LDL en personas que lo tengan alto, de modo similar a como actúan los aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados y aumenta además el colesterol HDL [16]. El aceite de oliva forma parte de los lípidos, los alimentos más ricos en calorías. Esto los convierte en la principal reserva de energía para el organismo y les da una función de protección contra la pérdida de calor y de protección de las vísceras. También forman las membranas celulares y las cubiertas de los nervios y forma parte de los tejidos del cerebro.

2.2. Variedades de aceituna

Existen muchas variedades de olivos, dedicados a la extracción de aceite. Dicho de otra forma, una subespecie de olivo de cultivo concreta va a producir frutos característicos de dicha especie, con unas características específicas cuyo aceite conservará, siempre que se haya extraído mediante procedimientos mecánicos o físicos que no alteren el producto [2].

En España se han llegado a catalogar más de 250 variedades de olivo. Sin embargo no todas esas variedades de olivo se cultivan por igual y son poco más de 20 las que

se han extendido. Sólo cuatro variedades abarcan el 60% de la olivicultura, y una sola de ellas, la variedad Picual, produce prácticamente la mitad del aceite español.

Con toda esta gama de variedades de olivo, es posible obtener tanto, aceites monovarietales como aceites varietales (diferentes variedades). Los monovarietales son aceites que proceden de una sola variedad de aceituna: por ejemplo aceite de oliva virgen extra de la variedad “Picual”. En un aceite monovarietal destacan las características sensoriales identificativas de la variedad. Los coupages son aceites en los que se han mezclado dos o más aceites monovarietales en proporciones concretas para complementar y modelar las características sensoriales en el aceite resultante. Esta práctica enriquece la experiencia sensitiva del consumidor. En Figura 2.5. se muestran las variedades más importantes de aceitunas destinadas a aceite, a mesa o a ambos usos, lo que se ha llamado doble aptitud.



Figura 2.5. Variedades de aceituna más importantes destinadas aceite y mesa.

En lo que respecta a la Provincia de Jaén, la variedad Picual representa más del 95% de la producción, el 5% restante son variedades dispersas de “Manzanilla de Jaén”, “Royal” en Sierra de Cazorla, y “Arbequina”.

Algunas de las variedades más conocidas y usadas son [10]:

Arbequina: la más representativa de Cataluña, produce aceites frutados, entre verdosos y amarillos, con aromas a manzana y a almendra fresca, suaves y dulces. La

planta es de poco vigor, con brotes largos y poco ramificados. La hoja es acanalada y ensanchada por el ápice, mientras que el fruto es pequeño, ovalado y casi simétrico.

Cornicabra: domina toda la zona central (Toledo, Ciudad Real y Madrid). Sus aceites son de color amarillo verdoso a oro. Aromas frescos y sabor entre dulce, amargo y algo picante. El árbol es de vigor medio con ramas de mediana longitud y con escasa formación de brotes. La hoja es larga y lanceolada y el fruto es largo curvo, asimétrico y con el vientre en forma de cuerno.

Empeltre: típica aceituna del Bajo Aragón. Con ella se elaboran aceites de color entre amarillo paja y oro viejo. Tienen aromas de frutas, sobre todo de manzana y un sabor suave y dulce. Árbol de gran vigor con ramas erguidos y hojas anchas y algo alabeadas. El fruto es asimétrico y alargado.

Hojiblanca: variedad dominante en Málaga y Córdoba, con doble aptitud para aceite y para mesa. Da aceites de color verde intenso, con aromas de frutas maduras y recuerdos de aguacate, presentado un sabor agradable con ligeras puntas de amargos y picor. El vigor del árbol es de medio a bueno con copa de densidad media. La hoja es alargada y parcialmente acanalada y el fruto es de tamaño grande y oblongo.

Picual: la gran variedad predominante en Jaén. Su aceite tiene una gran estabilidad y personalidad, fuerza, frutuosidad, un amargor intenso y claros tonos picantes. El vigor del árbol es bueno, con copas vigorosas y gran desarrollo foliáceo. La hoja es alargada y el fruto elipsoidal.

Picudo: o picuda también conocida como carrasqueña de Córdoba. Esta variedad se encuentra muy difundida en las provincias de Córdoba, Granada, Málaga y Jaén. Su aceite es delicado ante la oxidación. Se puede encontrar ligeros sabores y aromas que recuerdan a frutas exóticas, así como manzana y almendrados.

Farga: variedad originaria del sur de Tarragona y norte de Castellón y algo en la provincia de Teruel. Sus árboles son de gran vigor, porte abierto, con ramas rectas algo péndulas. Presentan una copa frondosa, donde los frutos se encuentran a veces aislados. Dichos frutos son de tamaño pequeño a mediano y cuelgan de un largo

pedúnculo. Su maduración es temprana y presentan una gran resistencia al desprendimiento. El rendimiento graso es elevado (26-28%), con aceites de muy buena calidad.

Blanqueta: se cultiva en Alicante y en el sur de Valencia. Produce aceites de tonalidad verde hoja y aromas frutados con notas de tomate verde. En boca desarrolla sensaciones picantes y suavemente amargas. El árbol es de poco vigor con ramos cortos, la hoja es corta y lanceolada y el fruto es algo ovalado y ligeramente asimétrico.

Cacereña: llamada también Manzanilla cacereña por su difusión en la provincia de Cáceres. Es una variedad de doble aptitud y muy apreciada para el aderezo, tanto en verde como en negra, por la calidad de su pulpa. Es un árbol de escaso vigor, con floración y maduración tempranas. Sus hojas son planas y de longitud media y los frutos tienen forma esférica, aunque algo asimétricos.

Verdial de Badajoz: está presente en las vegas del Guadiana. Produce aceites con aromas a aceituna verde y frutos secos (almendra). En la boca destaca por su dulzor. El árbol es resistente a la sequía y se emplea como patrón. El fruto es de gran tamaño y es de doble aptitud.

Carrasqueña: es una subvariedad de la manzanilla y se le conoce por este nombre en la provincia de Cáceres.

Lechín de Sevilla: se distribuye por las provincias de Sevilla y Córdoba, principalmente. Su aceite es relativamente inestable con un aroma medio y equilibrado y un sabor amargo. El árbol es vigoroso con ramas cortas y copa espesa. La hoja es corta y casi plana y el fruto es elipsoidal y algo abombado por el dorso.

Manzanilla: se cultiva en la provincia de Sevilla, principalmente en las proximidades de la capital. El árbol es de poco vigor y de copa poco densa. Las hojas son cortas y gruesas y el fruto es ovalado. Se emplea fundamentalmente como aceituna para aderezo.

Gordal: tanto su origen como su cultivo está vinculado a la provincia de Sevilla. El árbol es de vigor medio con ramos largos y gruesos. La hoja es alargada y muy recta y el fruto es de gran tamaño, acorazonado y algo asimétrico. Su aptitud es para aderezo. En la Tabla 2.2., se pueden observar algunas de las características de las variedades más comunes de aceituna para aceite de oliva.

Tabla 2.2. Índice de madurez y composición en ácidos grasos y en especies antioxidantes del aceite de oliva en algunas variedades [17].

Variedad	Índice madurez	Ácidos Grasos (%)							Tocoferoles Vitamina E (mg/Kg)	Polifenoles (mg/Kg)
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0		
Picual	2.80	11.51	1.24	2.80	78.93	3.87	1.16	0.38	322.00	790.00
Hojiblanca	2.98	11.72	0.99	3.05	69.04	12.76	1.68	0.31	463.00	209.00
Cornicabra	2.08	13.69	1.74	2.77	75.43	4.32	1.35	0.52	193.00	809.00
Lechín	2.64	12.99	1.03	1.77	69.25	12.58	1.40	0.34	191.00	766.00
Arbequina	1.84	17.33	2.06	1.58	62.30	14.97	1.14	0.34	237.00	195.00
Picudo	2.38	14.67	1.33	1.42	66.60	12.28	1.84	0.28	426.00	445.00
Empeltre	3.06	13.23	2.37	1.83	61.97	19.22	1.63	0.33	340.00	195.00
Manzanilla	3.33	15.45	1.16	3.38	68.19	9.04	1.38	0.50	287.00	454.00

En la Figura 2.6. se muestran fotos de las principales variedades de aceituna para la producción de aceite de oliva.



Figura 2.6. Principales variedades para la producción de aceite de oliva.

2.3. Normas de calidad para los diferentes tipos de aceite de oliva

La calidad de todo producto alimentario es una medida del grado de adecuación del mismo al uso esperado. Puede definirse como “el conjunto de aquellas características

de atributos individuales del mismo, que son significativos para determinar el grado de aceptación que aprecia, o debe apreciar el consumidor” [18].

En el aceite de oliva virgen, el patrón que define la calidad vendrá representado por “*un zumo oleoso obtenido de aceitunas en perfectas condiciones de madurez, procedentes de un olivo sano*”. El aceite será obtenido sobre un fruto fresco, evitando toda manipulación o tratamiento que altere la naturaleza química de sus componentes, tanto durante su extracción como en el transcurso de su almacenamiento. Conviene distinguir entre calidad del aceite y tipo, el cual viene determinado por ciertas características particulares, dentro de la denominada calidad, queda definido el tipo de aceite de oliva por las características sensoriales y componentes químicos, de forma que de dos variedades distintas o de una misma variedad situada en distinto suelo, clima o sometida a distintas técnicas de cultivo, se pueden originar diferentes tipos de aceites.

El COI estableció en la Resolución nº RES-6/88-IV/03 de 25 de junio de 2003, las denominaciones y definiciones de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva comercializados, así como en los intercambios intracomunitarios y con terceros países.

La UE, estableció una legislación [19], para la comercialización del aceite de oliva y orujo de obligado cumplimiento. Debido a que Estados Unidos no es miembro del COI, los grados comerciales tienen otras categorías legales, donde el organismo encargado es el *United States Department of Agriculture (USDA)*.

Dependiendo de la categoría a la que pertenezca el aceite de oliva, debe de cumplir con algunos criterios de calidad y pureza. Estos criterios pueden ser químicos-físicos y organolépticos. Para estos criterios existen límites que están establecidos en las normas oficiales como la del COI o el Reglamento (CEE) No 2568/91.

El COI en la Norma Comercial [20] aplicable a los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva, define como criterios de pureza y de calidad, los que se citan en los siguientes apartados.

2.3.1. Criterios de calidad

Son todos aquellos parámetros que aunque el consumidor no detecte, son medibles y permiten evaluar las características químicas del producto, definiéndose como *“el conjunto de características del aceite de oliva propias y permiten considerarlo como mejor, igual o peor”*.

La calidad de un aceite de oliva depende de la combinación de factores ambientales (clima y suelo), genéticos (variedad de aceituna) y agronómicos (técnicas de cultivo), y continúa con las operaciones de elaborado hasta el envasado. Los criterios de calidad que se aplican normalmente al aceite de oliva virgen vienen definidos por parámetros químicos y análisis sensorial de sus características organolépticas, definidas por los expertos a través de una cata.

Los criterios de calidad y sus límites establecidos para los distintos tipos de aceite de oliva se recogen a continuación según la Normativa COI, en la Tabla 2.3.

El Reglamento (CE) nº 1989/2003 [21], define las características físicas, químicas y organolépticas de los aceites de oliva y orujo de oliva, así como los métodos de valoración de esas características. Se legisló con el fin de reducir el número de análisis, para la clasificación de las muestras de los aceites de oliva, en los laboratorios de control que efectúen los análisis de calidad y pureza de los aceites, según el orden establecido en un esquema de decisiones, que habrá de adoptarse para comprobar la conformidad de una muestra con la categoría declarada, tal como se muestra en la Figura 2.7.

En función de dichos parámetros, el aceite de oliva queda clasificado en tres posibles categorías: “extra”, “virgen” o “lampante”, siendo susceptibles de ser envasados los dos

primeros y debiéndose refinar el último, sirviendo el aceite refinado de base para la confección de los denominados “aceites de oliva”, tras su mezcla con una cierta proporción de aceite “extra” o “virgen”.

Uno de los criterios de calidad de clasificación de los aceites de oliva es el grado de acidez, el COI estipula que el virgen extra no podrá superar 1°, mientras que el límite del virgen está en 2°. Sin embargo, en el reglamento de la UE nº 1513/2001 que se publican las definiciones de los aceites en el mercado, se indica que el aceite de oliva virgen extra tendrá 0.8° de acidez máxima.

En el mercado lo que vamos a encontrar más habitualmente son vírgenes extra con un grado de acidez entre el 0.3 y 0.8° y aceites vírgenes que no superan 1°. Dado que el aceite virgen que se comercializa no supera 1°, que es el límite fijado para el virgen extra, en el caso del COI, la diferencia real entre uno y otro radica en el análisis sensorial.

Tabla 2.3. Criterios de calidad y límites establecidos para los distintos tipos de aceite de oliva según COI/T.15/NC nº 3 [20].

	<i>Aceite de oliva extra virgen</i>	<i>Aceite de oliva virgen</i>	<i>Aceite de oliva virgen corriente</i>	<i>Aceite de oliva virgen lampante*</i>	<i>Aceite de oliva refinado</i>	<i>Aceite de oliva</i>	<i>Aceite de orujo de oliva crudo</i>	<i>Aceite de orujo de oliva refinado</i>	<i>Aceite de orujo de oliva</i>
4.1. Características organolépticas									
Olor y sabor					Aceptable	Bueno		Aceptable	Bueno
Olor y sabor (sobre una escala continua)									
Mediana del defecto	Me=0	0<Me≤2,5	2,5<Me≤6,0**	Me>6,0					
Mediana del frutado	Me>0	Me>0							
Color					Amarillo claro	Claro amarillo a verde		Claro amarillo a amarillo oscuro	Claro amarillo a verde
Aspecto a 20°C durante 24 horas					Límpido	Límpido		Límpido	Límpido
4.2. Acidez libre									
% m/m expresada en ácido oleico	≤0,8	≤2,0	≤3,3	>3,3	≤0,3	≤1,0	No limitada	≤0,3	≤1,0
4.3. Índice de peróxidos									
En meq. de oxígeno de los peróxidos por Kg de aceite	≤20	≤20	≤20	No limitado	≤5	≤15	No limitado	≤5	≤15

	Aceite de oliva extra virgen	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva virgen corriente	Aceite de oliva virgen lampante*	Aceite de oliva refinado	Aceite de oliva	Aceite de orujo de oliva crudo	Aceite de orujo de oliva refinado	Aceite de orujo de oliva
4.4. Absorbancia en UV ($K_{1CM}^{1\%}$)									
270 nm	≤0,22	≤0,25	≤0,3 ***		≤1,10	≤0,90		≤2,00	≤1,70
ΔK	≤0,01	≤0,01	≤0,01		≤0,16	≤0,15		≤0,20	≤0,18
232 nm	≤2,50**	≤2,60**							
4.5. Contenido en agua y en materias volátiles									
%m/m	≤0,20	≤0,20	≤0,20	≤0,3	≤0,1	≤0,1	≤1,5	≤0,1	≤0,1
4.6 Contenido en impurezas en el éter de petróleo % m/m	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,2	≤0,05	≤0,05		≤0,05	≤0,05
4.7 Punto de inflamación	-	-	-	-	-	-	≥120°C	-	-
4.8 Trazas metálicas mg/Kg									
Hierro	≤3,0	≤3,0	≤3,0	≤3,0	≤3,0	≤3,0		≤3,0	≤3,0
Cobre	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1		≤0,1	≤0,1

* La simultaneidad de los criterios 4.1, 4.2 y 4.3 no es obligatoria; puede bastar uno sólo

**O cuando la mediana del defecto sea inferior o igual a 2,5 y la mediana del frutado sea igual a 0.

***Después de pasar la muestra a través de alúmina activada, la absorbancia a 270 nm debe ser igual o inferior a 0,11.

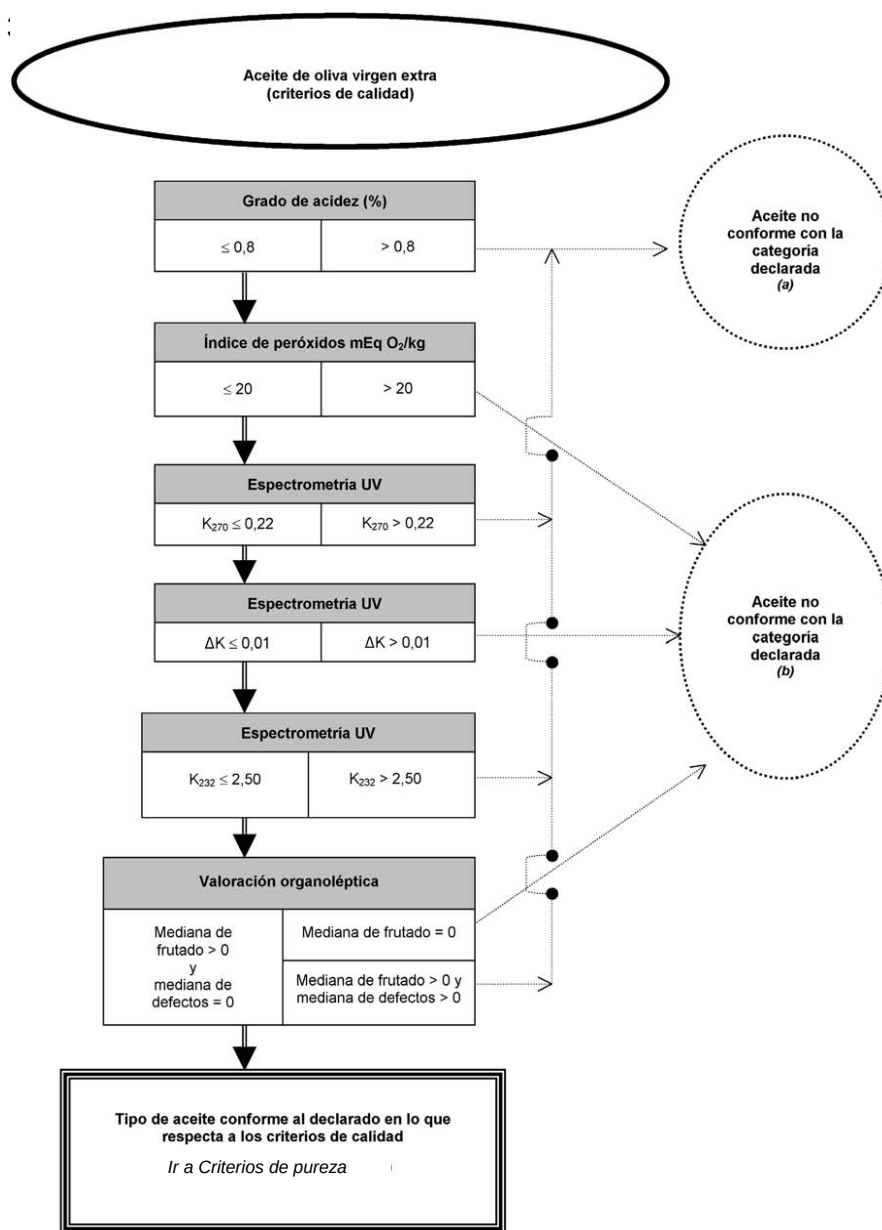


Figura 2.7. Criterios de calidad. Reglamento (CE) No 1989/2003 [21].

2.3.2. Criterios de pureza

La pureza de un aceite de oliva se evalúa mediante la determinación en el mismo, de un conjunto de componentes que permiten establecer su genuinidad. Estos componentes tienen dos orígenes diferentes: aquellos que están presentes de forma natural y los que se forman por transformación de componentes naturales durante los procesos de obtención [22].

En la Norma Comercial del COI aplicable a los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva, se mencionan los criterios de pureza, en la que todos los aceites de oliva vírgenes han de tener unas características comunes. Por ejemplo, la composición en ácidos grasos debe corresponder a los del aceite de oliva. Respecto al perfil de ácidos grasos, se exigen unos porcentajes menor o igual a 0,05%, 0,3%, 0,3%, 1,0%, 0,6%, 0,4%, 0,2% y 0,2% para los ácidos mirístico, heptadecanoico, heptadecenoico, linoleico, linolénico, araquídico, eiosenoico, behénico y lignocérico, respectivamente. En cuanto al contenido en esteroides ha de ser como mínimo, 1 mg/Kg de aceite y su perfil debe cumplir una serie de requisitos. A continuación, en la Figura 2.8. se recogen los criterios de pureza según el Reglamento (CE) No 1989/2003 [21].

2.3.3. Denominaciones comerciales del aceite de oliva

Una vez definidas las características comunes a todos los aceites de oliva vírgenes, se clasifican en cuatro categorías comerciales. Las denominaciones y definiciones comerciales para el aceite de oliva son las siguientes:

- a. El aceite de oliva, es el aceite procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Se comercializará según las denominaciones y definiciones siguientes:

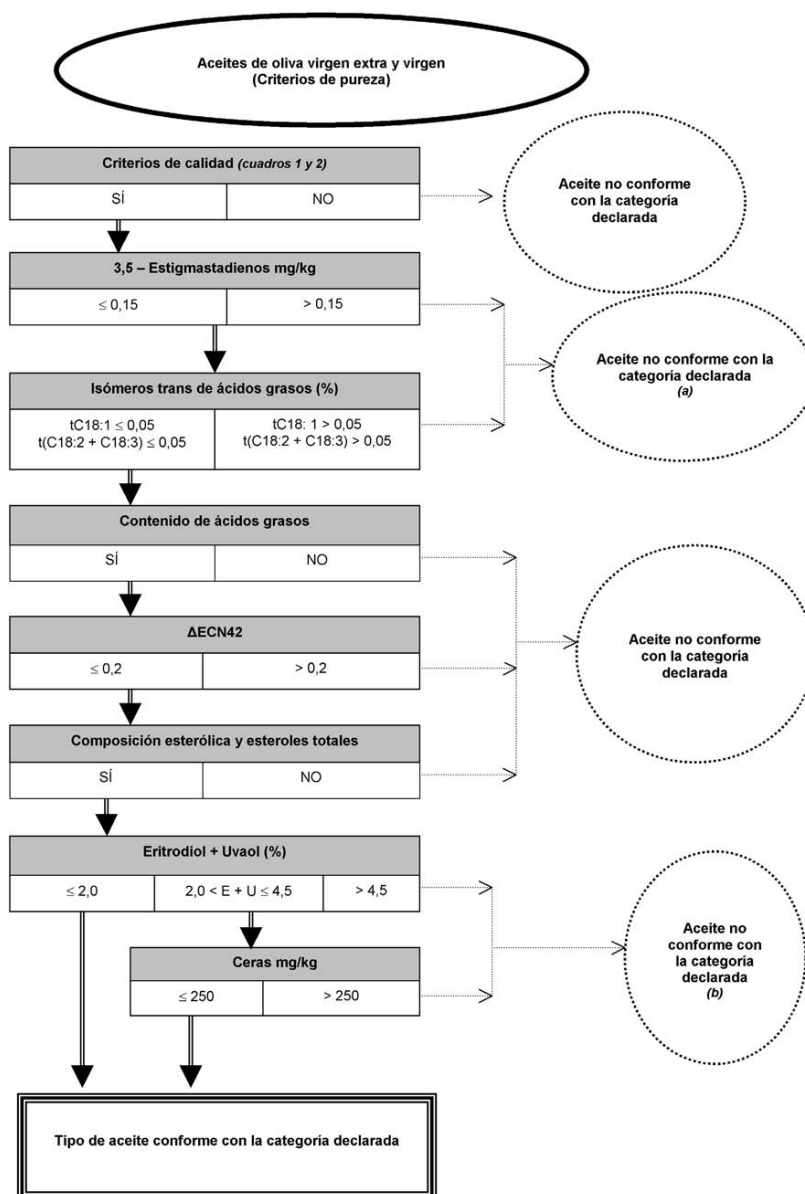


Figura 2.8. Criterios de pureza. Reglamento (CE) No 1831/2003 [21].

a.1. Los aceites de oliva vírgenes, son los aceites obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones,

especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado.

a.1.1. Los aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen incluyen:

i) *El aceite de oliva virgen extra*: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico, es como máximo de 0,8 gramos por 100 gramos y cuyas demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la Norma del COI.

ii) *El aceite de oliva virgen*: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico, es como máximo de 2 gramos por 100 gramos y cuyas demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la Norma.

iii) *El aceite de oliva virgen corriente*: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico, es como máximo de 3,3 gramos por 100 gramos y cuyas demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la Norma¹.

a.1.2. El aceite de oliva virgen no apto para el consumo en la forma en que se obtiene, denominado aceite de oliva virgen lampante: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es superior a 3,3 gramos por 100 gramos y/o cuyas características organolépticas y demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la Norma. Se destina a las industrias de refinado o a usos técnicos.

a.2. *El aceite de oliva refinado*, es el aceite de oliva obtenido de los aceites de oliva vírgenes mediante técnicas de refinado que no provoquen ninguna modificación de la estructura glicerídica inicial. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 gramos por 100 gramos y sus demás características corresponden a las fijadas para esta categoría ²

¹ Este producto sólo puede ser vendido directamente al consumidor si está permitido en el país de venta al por menor. De no estarlo, la denominación de este producto se ajustará a las disposiciones legales del país en cuestión.

² Este producto sólo puede ser vendido directamente al consumidor si está permitido en el país de venta al por menor.

a.3. *El aceite de oliva*, es el aceite constituido por la mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 gramo por 100 gramos y sus demás características corresponden a las fijadas para esta categoría ³.

b. *El aceite de orujo de oliva* es el aceite obtenido por tratamiento con disolventes u otros procedimientos físicos de los orujos de oliva, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Se comercializará según las denominaciones y definiciones siguientes:

b.1. *El aceite de orujo de oliva crudo*, es el aceite de orujo de oliva cuya presente Norma, lo destina al refinado con vistas al consumo humano o a usos técnicos. Sus características corresponden a las fijadas para esta categoría.

b.2. *El aceite de orujo de oliva refinado*, es el aceite obtenido a partir del aceite de orujo de oliva crudo por técnicas de refinado que no provoquen ninguna modificación de la estructura glicerídica inicial. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 gramos por 100 gramos y sus demás características corresponden a las fijadas para esta categoría.

b.3. *El aceite de orujo de oliva₁* es el aceite constituido por la mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceite de oliva virgen apto para el consumo en la forma en que se obtiene. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 gramo por 100 gramos y sus demás características corresponden a las fijadas para esta categoría. Esta mezcla no podrá en ningún caso denominarse "*aceite de oliva*".

2.3.4. Análisis organoléptico

³ El país en el que el producto se venda al por menor puede exigir una denominación precisa.

El análisis sensorial se aprovecha de la capacidad de los sentidos para reaccionar ante estímulos químicos, físicos y físicoquímicos. El sistema nervioso periférico permite la interconexión entre el entorno y el cerebro, que al estar dentro del cráneo obviamente no puede interactuar directamente con el mundo exterior.

Los cinco sentidos permiten evaluar las siguientes propiedades sensoriales:

- Apariencia, color y forma mediante la vista.
- Consistencia y las características relacionadas con la fluidez, viscosidad, dureza, fibrosidad, crujiente, flexibilidad, mediante el tacto y el oído.
- Aroma mediante el olfato
- Sensaciones gustativas mediante el gusto
- Sabor mediante una combinación del olfato, gusto y tacto.

El mejor método para evaluar las características sensoriales del aceite de oliva virgen es el análisis descriptivo cuantitativo, conocido como panel de cata [23], que fue desarrollado por el COI, durante muchas reuniones de expertos de la cuenca mediterránea. Al aplicar procedimientos estadísticos a los datos provenientes de los expertos, se obtuvieron unos resultados con una fiabilidad similar, debido a sus niveles significativos, a la de otros métodos normalmente utilizados en otros campos científicos. El panel de cata tiene como fin sustituir un juicio individual por el criterio medio, de un grupo de catadores. En la Figura 2.9., se observa un análisis descriptivo cuantitativo para tres tipos de muestra diferentes.

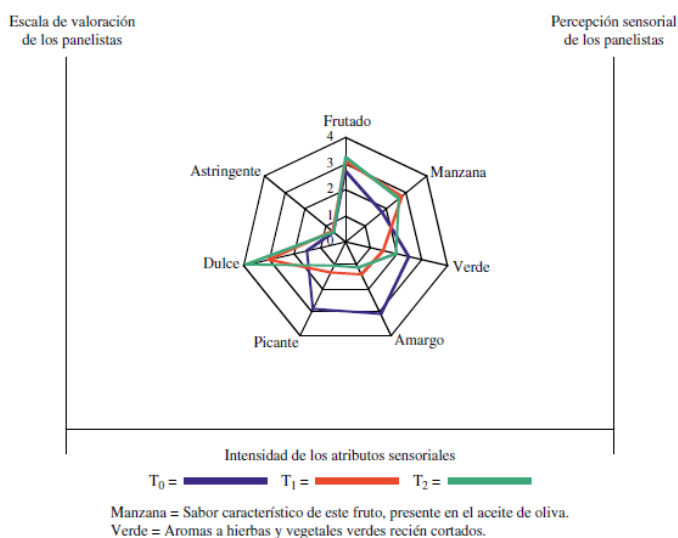


Figura 2.9. Análisis descriptivo cuantitativo de tres aceites evaluados, con sus características organolépticas diferentes [24].

Los paneles de cata son los encargados de clasificar los aceites de oliva vírgenes, y los que deciden a través del análisis sensorial cuándo un aceite puede llevar la etiqueta de “virgen extra”. Delimitar la frontera entre el virgen extra y el virgen es un trabajo crítico. La cata no es una ciencia exacta, pero de su seriedad depende la confianza del mercado. Comprende las siguientes fases [25]:

- Análisis visual
- Análisis olfativo
- Análisis gustativo
- Análisis táctil
- Equilibrio – armonía

La metodología, incluida en las regulaciones de la UE desde 1991, determina como instrumento de medida a un grupo de personas de 8 a 12, seleccionadas de una manera regulada y entrenadas convenientemente para identificar y medir la intensidad

de las diferentes sensaciones positivas y negativas percibidas por sus sentidos. La elección de un grupo de personas permite promediar las diferencias que existen en los umbrales de algunos olores dependiendo de las personas, probablemente relacionadas con factores genéticos, culturales y ambientales, y así el resultado final representa a todos los consumidores.

Las condiciones ambientales del análisis sensorial están basadas en la comodidad del catador. Han de controlarse, el volumen y la temperatura de cada muestra de aceite, la forma y las dimensiones de la copa para la prueba y el color del cristal. La temperatura de cata del aceite de oliva es de 28°C. Es ésta temperatura es la que permite la volatilidad de los compuestos aromáticos en un líquido denso y graso. Para el aceite de oliva se llevan a cabo los mismos pasos analíticos que en la cata de otros productos líquidos como, por ejemplo, el vino: se coloca cada muestra en una copa diferente, se tapa, se huele y se degusta. Entre cada cata de aceite, para quitar el gusto de la muestra anterior, se come un pedazo de manzana y se bebe un sorbo de agua. La sala de cata tiene una serie de cabinas. Cada catador realiza la prueba en privado en una cabina, regulada en su tamaño y equipamiento. La presentación de las muestras se hace al azar para evitar el efecto memoria y su número es normalmente bajo para evitar la fatiga. En la Figura 2.10. se representa en la foto una cabina para la cata del aceite de oliva, donde se encuentra el baño maría para obtener la temperatura del aceite catado y lo necesario para su análisis.



Figura 2.10. Cabina equipada para la realización de la cata de aceite de oliva [26].

En el mencionado vocabulario general se incluyen términos como: aspecto, atributo, panel, percepción, sensibilidad, catador, respuesta, fatiga sensorial, estímulo, aroma sabor, textura, etc. Por otra parte, el vocabulario específico recoge términos que a una persona no experta, lógicamente, los resultarán menos intuitivos.

Para solucionar el problema derivado del hecho de que las percepciones varían de una persona a otra debido a las propias experiencias de cada sujeto, es por ello que los conceptos son subjetivos, los catadores deben usar el mismo vocabulario. Una parte de este vocabulario es común a todos los alimentos, es el denominado “vocabulario general”. El “vocabulario específico” fue desarrollado por los expertos del COI para el análisis del aceite de oliva virgen, tal como se muestra en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Vocabulario específico de atributos sensoriales que han de conocer los miembros de panel de cata [27].

<i>Atributos negativos</i>	
Mohoso	Sabor característico del aceite de oliva obtenido de olivas almacenadas en pilas
Mohoso – húmedo	Sabor característico del aceite obtenido de olivas almacenadas en condiciones de humedad durante varios días
Sedimento fangoso	Sabor característico del aceite que ha estado en contacto con los sedimentos depositados en los tanques subterráneos y las tinajas
Avinado – Avinagrado	Sabor característico de algunos aceites que recuerda al vino o vinagre. Esto es debido a la fermentación de las aceitunas que hace que se forma ácido acético, acetato etílico y etanol
Metálico	Sabor que recuerda al metal característico de los aceites que se obtienen en plantas de procesamiento nuevas u obtenidos al principio de la cosecha
Rancio	Sabor resultado de un proceso oxidativo al estar en contacto con el aire
<i>Atributos positivos</i>	
Afrutado	Serie de sensaciones olfativas que dependen de la variedad de la oliva. Se perciben por medio de la nariz
Amargo	Sabor característico del aceite que se obtiene sobre todo de aceitunas verdes
Picante	Sensación característica de los aceites producidos al principio de la cosecha, principalmente con aceitunas sin madurar
<i>Otros atributos negativos</i>	
Quemado	Sabor característico de los aceites que son calentados excesivamente durante el proceso, especialmente cuando la pasta se mezcla térmicamente si se hace en condiciones inadecuadas
Heno-madera	Sabor característico de los aceites producidos con olivas que se han secado

El afrutado, es la sensación evocadora de la aceituna madura, se evalúa mediante la inhalación directa, mientras que el resto de sensaciones se perciben por vía retronasal, ya que su identificación es más precisa al tardar el estímulo más tiempo en desaparecer. Los catadores utilizan una hoja de perfil (Figura 2.11.), que es fijada por las normas [23, 27, 28], para realizar un análisis de clasificación comercial, común a todos los paneles oficiales del mundo. En ésta se recoge la valoración que un catador miembro de un papel oficial tendrá que cumplimentar. Puede observarse que en la parte superior aparecen los atributos negativos (defectos) teniendo que ser valorada la intensidad de percepción de los mismos en una escala no estructurada de 10 cm y en la parte inferior tres atributos positivos que caracterizan el sabor del aceite, afrutado, amargo y picante.

HOJA DE PERFIL	
PERCEPCION DE DEFECTOS	INTENSIDAD
Mohoso	_____>
Húmedo	_____>
Avinado-avinagrado	_____>
Sedimento fangoso	_____>
Metálico	_____>
Rancio	_____>
Otros (especificar)	_____>
PERCEPCION DE ATRIBUTOS POSITIVOS	
Afrutado	_____>
Amargo	_____>
Picante	_____>
<u>Nombre del catador:</u>	<u>Código de la muestra</u>
	<u>Fecha</u>

Figura 2.11. Hoja de perfil para el análisis sensorial del aceite de oliva [23].

Para el análisis de resultados, el jefe de panel deberá recoger las fichas de cata cumplimentadas por cada uno de los catadores, controlar las intensidades asignadas a los diferentes atributos, y, si comprueba alguna anomalía, solicitar al catador que revise su ficha de cata y, en caso necesario, que repita la prueba.

El jefe de panel puede introducir los datos de cada catador en un programa informático conforme al método de cálculo estadístico de la mediana indicado en el apéndice B de Reg. CE N° 640/2008 [28]. La introducción de datos para cada muestra deberá realizarse mediante una matriz compuesta de nueve columnas correspondientes a los nueve atributos sensoriales y de n líneas correspondientes a los n miembros del panel de cata. Cuando al menos el 50 % del panel inscriba un atributo negativo en el apartado "Otros"

(Figura 2.11.), se calculará la mediana de ese defecto y el aceite se clasificará en consecuencia. El jefe de panel solo podrá certificar que el aceite evaluado cumple las condiciones mencionadas en lo que atañe a los términos verde y maduro cuando al menos el 50 % del panel haya señalado

haber percibido el carácter verde o maduro del atributo frutado. Para los análisis de control, se realizará un ensayo. Para los contraanálisis, el jefe de panel deberá proceder a la realización del análisis por duplicado. Por último, en los análisis dirimentes, la valoración deberá ser realizada por triplicado. En estos casos, la mediana de los atributos se calculará a partir de la media de las medianas.

Una vez realizada la prueba por los catadores, y en función de la intensidad del defecto mayoritario, son clasificados los aceites de acuerdo con el valor de la mediana. Si la mediana de los defectos es igual a 0 y la del atributo frutado superior a 0, el aceite es clasificado como *virgen extra*; si la mediana de los defectos es superior a 0 e inferior o igual a 3.5 y la del atributo frutado superior a 0, es *virgen*; y si la mediana de los defectos es superior a 3.5, o bien, la mediana de los defectos es inferior o igual a 3.5 y la del atributo frutado es igual a 0, será *lampante*.

Desde el punto de vista de la clasificación comercial del aceite, las diferentes categorías se establecen según los siguientes límites expuestos en la Tabla 2.5. En el caso de muestras de análisis contradictorios, las evaluaciones deben realizarse por triplicado en días diferentes.

Tabla 2.5. Clasificación de aceites vírgenes según los resultados del análisis sensorial [28].

<i>Categoría</i>	<i>Mediana (Me) del defecto de la mayor intensidad</i>	<i>Mediana del frutado</i>
Virgen extra	0	>0
Virgen	0<Me<3.5	>0
Lampante	Me>3.5 Me≤3.5	=0

Cuando la mediana de los atributos positivos distintos de frutado sea superior a 5.0, el jefe de panel lo hará constar en el certificado de análisis del aceite. El catador podrá abstenerse de catar un aceite cuando aprecie por vía olfativa directa algún atributo negativo sumamente intenso, circunstancia excepcional que deberá indicar en la ficha de cata.

2.4. Composición química del aceite de oliva

Los constituyentes del aceite de oliva virgen pueden clasificarse en dos grandes grupos (ver Figura 2.12.): uno mayoritario, la fracción saponificable, y otro presente en menor proporción, los componentes minoritarios o fracción insaponificable [29].

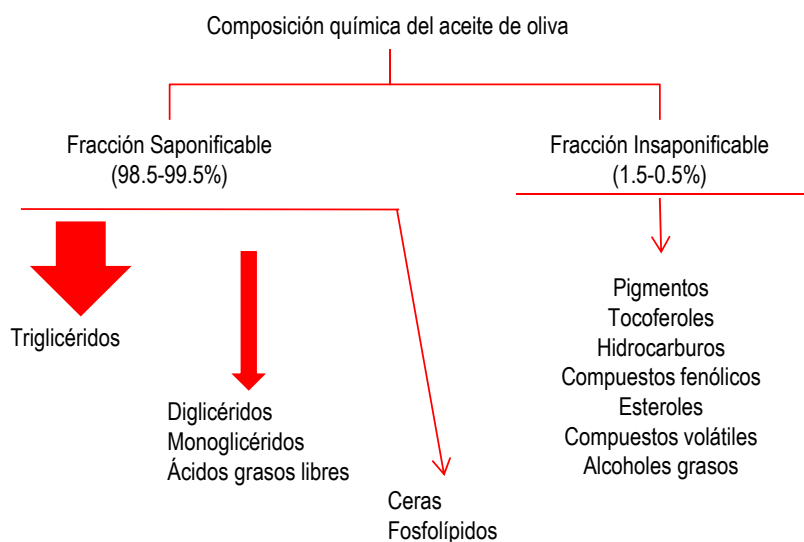


Figura 2.12. Esquema de la composición química del aceite de oliva.

2.4.1. Fracción saponificable

Representa entre el 98.5% y el 99.5% del peso del aceite de oliva. Entre los constituyentes de la fracción saponificable están los triglicéridos, que son los componentes principales del aceite de oliva, ya que las aceitunas, al igual que la mayoría de los cultivos oleaginosos, acumulan lípidos en forma de distintas especies moleculares de triglicéridos. También se encuentran presentes en una proporción mucho menor: monoglicéridos y diglicéridos en pequeña cantidad, 0.2% y ácidos grasos totales 1.3% respectivamente, así como las ceras y fosfolípidos en menor proporción.

2.4.1.1. Ácidos grasos

El conocimiento de la composición en ácidos grasos del aceite de oliva, tanto cuantitativa como cualitativamente, ha sido siempre un tema de gran interés debido a su importancia en la descripción y detección de posibles adulteraciones.

El aceite de oliva es una grasa vegetal que se diferencia de otras grasas vegetales en su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. La presencia de ácidos grasos libres le confiere al aceite su carácter más o menos ácido, dependiendo de la mayor o menor concentración de éstos. Pero salvo en contadas ocasiones, los ácidos grasos, no se encuentran como ácidos grasos libres, y cuando lo están, es tan sólo en pequeñas concentraciones, debido a que en su gran mayoría los ácidos grasos se encuentran formando ésteres, habitualmente combinados con glicerina, en forma de triglicéridos. También pueden formar ésteres con alcoholes grasos de estructura lineal (ceras) o terpénica (ésteres de terpenos y ésteres de esteroides).

La mayoría de los ácidos grasos están presentes en forma de triacilgliceroides, los cuales constituyen el 98% de la composición total del aceite. La distribución de los ácidos grasos en estos triglicéridos sigue un patrón en el que el ácido graso que ocupa la posición central en la molécula de glicerol siempre es un ácido graso insaturado, generalmente el ácido oleico [30]. La distribución de las especies de triglicéridos se presenta en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Composición y porcentaje de triacilgliceroides del aceite de oliva [5].

<i>Triglicéridos</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
OOO	40-59
POO	15-22
OOL	12-20
POL	5.5-7
PLO	4-5

SOO	3-7
POP	2- a menos

O, Ácido oleico; P, ácido palmítico; L, ácido linoleico; S, ácido esteárico

El aceite de oliva es rico en ácido oleico (monoinsaturado), contiene cantidades moderadas de ácidos palmítico y linoleico y un bajo porcentaje de ácidos esteárico y linolénico [5], tal como se ilustra en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Porcentaje de los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de oliva. Comisión del Codex Alimentarius (1993).

Ácidos Grasos	Límites %
Mirístico (14:0)	0.0-0.1
Palmítico (16:0)	7.5-20.0
Palmitoleico (16:1)	0.3-3.5
Heptadecanoico (17:0)	0.0-0.5
Heptadecenoico (17:1)	0.0-0.6
Esteárico (18:0)	0.5-5.0
Oleico (18:1)	55.0-83.0
Linoleico (18:2)	3.5-21.0
Linolénico (18:3)	0.0-1.5
Araquídico (20:0)	0.0-0.8
Eicosanoico (20:1)	No especificado
Behénico (22:0)	0.0-0.2
Lignocérico (24:0)	0.0 – 1.0

Ha crecido el interés en el estudio de las características químicas del aceite de oliva en función de su origen, entendido como conjunto de factores (variedad, zona de producción, técnicas agronómicas, época de recogida, etc.) que confluyen en la caracterización del mismo. La composición en ácidos grasos del aceite de oliva varía ligeramente dependiendo de la variedad y del grado de madurez de las olivas, así como de las condiciones climáticas y la latitud [31]. El perfil de ácidos grasos del aceite, así como la composición en triglicéridos han sido utilizados por numerosos autores como parámetros de clasificación geográfica del aceite [32].

2.4.2. Fracción insaponificable

Es difícil determinar de forma precisa la totalidad de los constituyentes menores del aceite de oliva, debido a su naturaleza compleja y a su baja concentración. Una forma simple de resolver el problema es la determinación de la materia insaponificable. Se define como *“el conjunto de productos presentes en la sustancia analizada, que después de la saponificación con un hidróxido alcalino y de la extracción con un determinado disolvente, quedan como no volátiles”*. La fracción insaponificable representa un porcentaje menor o igual al 1.5% del peso del aceite, sin embargo, tiene una gran importancia desde el punto de vista del valor biológico del aceite y de la conservación del mismo [5].

La fracción no glicérica del aceite de oliva contiene hidrocarburos, esteroides, alcoholes triterpénicos, tocoferoles, fenoles, pigmentos, compuestos fenólicos, compuestos volátiles y aromáticos (Tabla 2.8.).

Algunos de estos componentes minoritarios del aceite de oliva virgen están implicados en propiedades tan importantes como la estabilidad frente a la oxidación. Entre éstos, cabe destacar los pigmentos (clorofilas y carotenos), compuestos fenólicos y los tocoferoles. A continuación se describen las principales familias de compuestos de interés de la fracción insaponificable del aceite de oliva.

Tabla 2.8. Principales componentes de la fracción insaponificable [1].

Compuestos	Cantidad o proporción
Terpenos: Escualeno Carotenos	300 – 700 mg/100 g 0.5 – 10 mg/Kg (Expresado como β – caroteno)
Clorofilas	0 – 9.7 mg/Kg
Tocoferoles α –tocoferol	7 – 30 mg/100 g $\geq 93\%$

β y γ – tocoferol	$\leq 10\%$ de total de tocoferoles
δ – tocoferol	$\leq 10\%$
<i>Esteroles</i>	
Campesterol	80 – 240 mg/100 g
Estigmasterol	2.0 – 3.0%
β – sitosterol	1.0 – 2.0 %
+ Δ_5 avenasterol	95 – 97 %
<i>Compuestos fenólicos</i>	50 – 500 mg/Kg (expresado como ácido cafeico)
<i>Alcoholes</i>	Resto de cantidades pequeñas
<i>Cetonas</i>	
<i>Eteres</i>	
<i>Ésteres</i>	
<i>Derivados furánicos</i>	

2.4.2.1. Compuestos fenólicos

A menudo el término de “polifenoles”, “compuestos fenólicos” o “fenoles” se usa frecuentemente para aquellas sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos a él [33], tal como podemos observar en la Figura 2.13.

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son parte de la fracción polar que se obtiene normalmente por extracción del aceite con metanol/agua. En numerosos trabajos se denominan polifenoles, aunque es un término convencional porque no todos ellos son polihidroxiderivados. Su papel ha sido extensamente investigado desde los años 60 [33-39]. En aquellos tiempos, las primeras investigaciones establecieron una serie de prioridades en la investigación de los compuestos fenólicos basadas en:

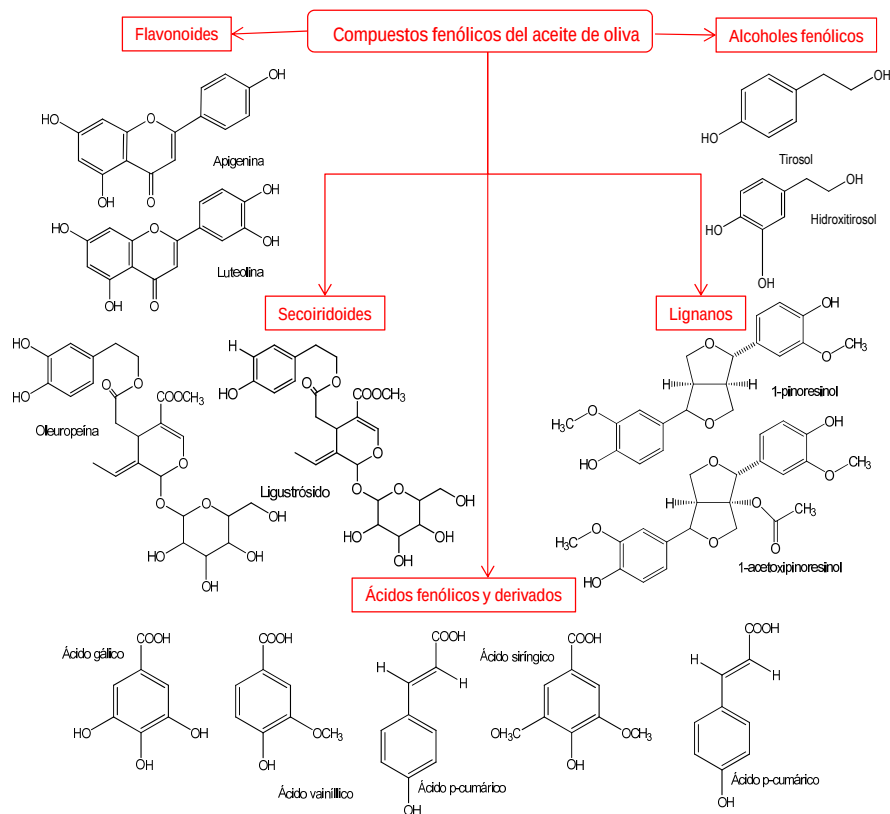


Figura 2.13. Estructura química de los polifenoles más representativos del aceite de oliva virgen.

- Desarrollo de un procedimiento analítico para cuantificar los compuestos fenólicos en los aceites
- Estimación de los niveles de compuestos fenólicos en aceites vegetales
- Posible relación entre estos compuestos y las características del fruto (variedad, grado de madurez...)
- Efecto de la tecnología de extracción y los procesos de refinado en el nivel de compuestos fenólicos
- Importancia de los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales

Los polifenoles son una fracción compleja, constituida por más de medio centenar de compuestos, que presentan diferentes estructuras químicas. Entre ellos, han sido identificados los fenoles simples como hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, ácido vainílico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, vainillina; flavonoides como luteolina y apigenina [33], así como otros compuestos más complejos, ácido elenólico y secoiridoides, como los derivados de la oleuropeína, ligustrósidos, ligustalósidos y verbascósidos [33, 40].

Las referencias que hay en relación con el contenido de polifenoles totales en el aceite de oliva, presentan cifras muy variables en función de la ubicación del estudio, de la variedad de aceituna [38, 41-45], los valores encontrados por diversos investigadores, apenas si pueden ser comparados en lo referente al contenido de polifenoles totales y a cantidades individuales.

Los métodos más utilizados para evaluar el contenido en polifenoles del aceite de oliva son, el ensayo colorimétrico con el reactivo Folin-Ciocalteu [46] y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El primer método proporciona sólo información semi-cuantitativa y el contenido ha de ser referido a un compuesto estándar (normalmente se usa ácido cafeico), lo que supone una limitación debido al gran número de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva. Por otro lado, la técnica cromatográfica es un método más sensible y específico, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, en los últimos años se han realizado diversos estudios para de la caracterización de los polifenoles en el aceite de oliva [47-50] empleando como técnica el HPLC.

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son en parte diferentes a los presentes en el fruto debido a causas físicas, por un reparto de los componentes entre la fase oleosa y el agua de vegetación, así como por la incorporación a la pasta de componentes que proceden de las semillas. También debido a reacciones de oxidación e hidrólisis favorecidas por el pH ácido del medio, a la puesta en contacto de las

enzimas hidrolíticas con sus sustratos y a la acción de la polifenoloxidasas, muy abundante en la pulpa la cual se oxida y polimeriza parte de los compuestos fenólicos presentes [51].

- Ácidos fenólicos y derivados

Los ácidos fenólicos o ácidos fenolcarboxílicos presentan en su estructura básica un anillo fenólico y una función orgánica de ácido carboxílico (C6-C1, ácidos benzoicos) y C6-C3 (ácidos cinámicos), como los ácidos cafeico, vainílico, siríngico, ferúlico, p-cumárico, o-cumárico, protocatecuico, sinápico, gálico, benzoico y p-hidroxibenzoico, que fueron el primer grupo de fenoles que se determinaron en el aceite [37, 52], representan una fracción minoritaria. En la Figura 2.14., se detallan las estructuras de los principales ácidos fenólicos y derivados del aceite de oliva.

- Secoiridoides

Bajo la denominación de iridoides se agrupan una serie de monoterpenos bicíclicos (C10) derivados biosintéticos del monoterpeno geraniol, que presentan como estructura básica común un ciclopentapirano denominado "*iridano*", por haberse detectado la primera vez en hormigas pertenecientes al género *Iridomirmex*. Estos compuestos pueden encontrarse como estructuras abiertas (secoiridoides) o cerradas (iridoides) generalmente en forma heterocíclica, mayoritariamente como glucósidos.

Los compuestos fenólicos que están en una mayor concentración en el aceite son los secoiridoides, que se caracterizan por la presencia del ácido elenólico o alguno de sus derivados [52].

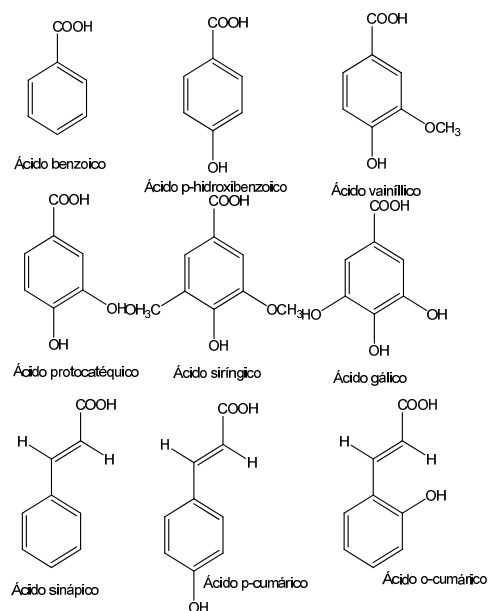


Figura 2.14. Estructura de los principales ácidos fenólicos y derivados.

La aceituna contiene compuestos secoiridoides en forma libre y glucosilados, siendo la oleuropeína la mayoritaria. Además, contiene ligustrósido y algunas sustancias como la demetiloleuropeína. A este grupo fenólico se le atribuye el amargor característico del fruto verde de la aceituna [39] (Figura 2.15.)

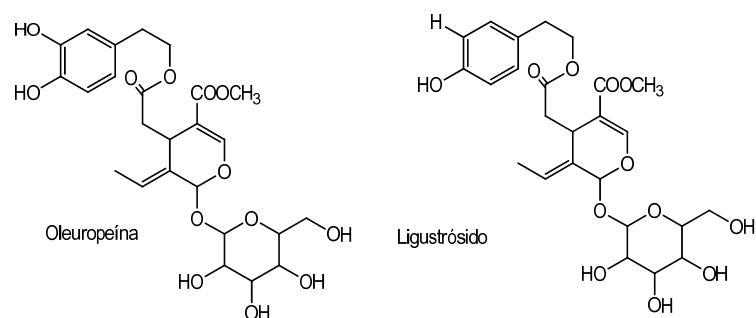


Figura 2.15. Estructura de los principales compuestos fenólicos secoiridoides glucosilados en la aceituna.

Durante el proceso de extracción del aceite de oliva virgen se producen una serie de modificaciones en la estructura química de los secoiridoides del fruto, dando lugar a agliconas con estructuras diversas [37, 53, 54]. Montedoro y col. [33], propusieron estructuras de algunos de los derivados secoiridoides mayoritarios, tal como se observa en la Figura 2.16., las que han sido confirmadas por numerosas investigaciones mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR *spectroscopy*) y cromatografía líquida - espectrometría de masas con tiempo de vuelo (TOF-MS) y/o espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) [48, 55-58]. El derivado secoiridoide mayoritario en el aceite de oliva es la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA). También está presente la forma dialdehídica derivada del ligustrósido (p-HPEA-EDA), comúnmente denominada oleocantal, descrita como molécula con actividad antiinflamatoria [59]. Además de estos dos compuestos fenólicos mayoritarios, en el aceite de oliva se han identificado otros derivados secoiridoides como la forma aldehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EA), isómero de la oleuropeína aglicona, y la forma aldehídica del ácido elenólico unida al tirosol (p-HPEA-EA), isómero del ligustrósido aglicona.

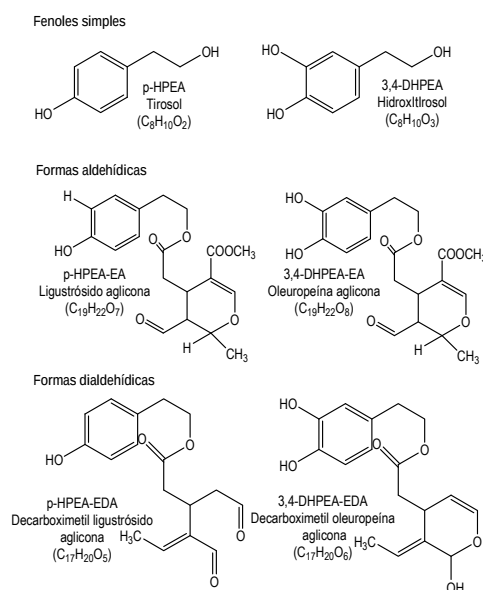


Figura 2.16. Estructura de los principales fenoles simples y derivados secoiridoides.

La hidrólisis de los derivados secoiridoides da origen a sus formas más simples como el hidroxitirosol (3,4-DHPEA) y el tirosol (p-HPEA) [37], también se hidrolizan compuestos como hidroxitirosol acetato [38], 3,4-DHPEA-AC [38], tirosol acetato [60] y la forma glicosilada del hidroxitirosol [61].

La forma dialdehídica del ácido elenólico (EA) unida al hidroxitirosol o tirosol y un isómero de la oleuropeína aglicona se muestran en la Figura 2.17. Otros estudios realizados encuentran la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona a partir de la oleuropeína [52].

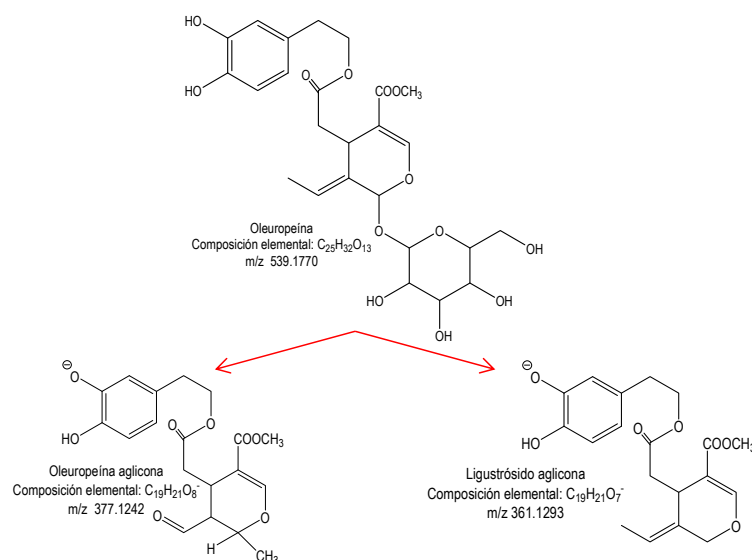


Figura 2.17. Estructura de los fragmentos de iones principales de la oleuropeína [52].

- Alcoholes fenólicos

Los alcoholes fenólicos son: hidroxitirosol o (3,4-dihidroxifenil)etanol, tirosol o (p-hidroxifenil)etanol y (3,4- dihidroxifenil)etanol glucósido.

La principal fuente de hidroxitirosol en la dieta es el aceite de oliva, presente sobre todo como derivados secoiridoides o como acetato [60]. El hidroxitirosol y sus derivados se derivan de la oleuropeína (éster de hidroxitirosol y ácido elenólico) presentes en las aceitunas durante la extracción de aceite de oliva (Figura 2.18.). Factores como la variedad, la madurez de la aceituna, la extracción del aceite de oliva o incluso factores agronómicos determinan la cantidad final de compuestos fenólicos detectados en aceite de oliva virgen. Los compuestos fenólicos se encuentran entre 100 y 600 mg/Kg, de los cuales aproximadamente la mitad de esta cantidad corresponde a la oleuropeína, hidroxitirosol y sus derivados [38].

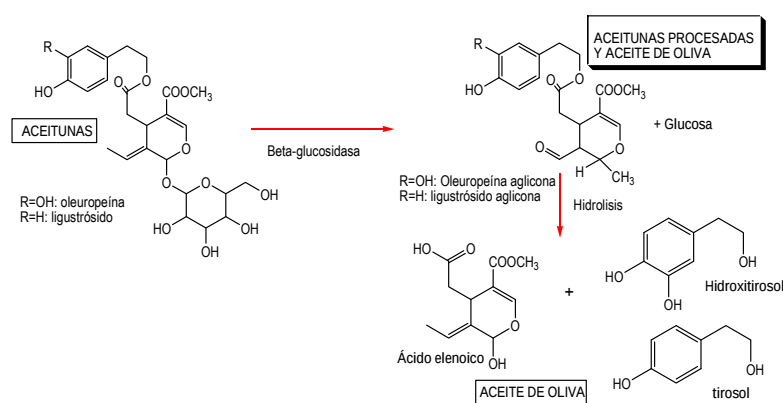


Figura 2.18. Estructuras de los fenoles presentes en las aceitunas y aceite de oliva, su degradación en agliconas durante el procesado, y la hidrólisis de agliconas en tirosol e hidroxitirosol [62].

- Flavonoides

Los flavonoides del aceite de oliva que fueron identificados en primer lugar son las flavonas luteolina y apigenina, presentes en forma libre y glucosiladas [57]. Las formas glucosiladas se encuentran en el fruto, mientras que las formas libres son las mayoritarias en el aceite de oliva. Su estructura se detalla en la Figura 2.13.

- Lignanos

La cantidad de lignanos presentes en el aceite de oliva virgen puede ser hasta de 100 mg/Kg, pero hay variaciones considerables entre distintos aceites [63]. La presencia de (+)1-pinoresinol y (+)1- acetoxipinoresinol, ha sido confirmada en diversas muestras de aceites de oliva, dentro de la fracción fenólica de los lignanos. (Figura 2.19). Los aceites españoles, contienen éstos compuestos dentro del rango de 20 a 25 mg/Kg para el (+)1- acetoxipinoresinol, y de 2 a 95 mg/Kg para el (+)1-pinoresinol [38].

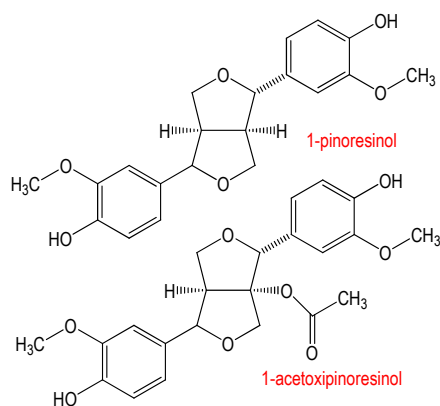


Figura 2.19. Estructuras de los lignanos presentes en aceite de oliva.

2.4.2.2. Clorofilas y otros pigmentos

El aceite de oliva tiene un color que va desde el verde-amarillo hasta el dorado, dependiendo de la variedad y del estado de madurez del fruto. La composición del contenido total de pigmentos presentes de forma natural en el aceite de oliva, son los parámetros más importantes para la determinación de su calidad, ya que están relacionados con el color, que es uno de los atributos básicos para evaluar la calidad del aceite de oliva. Los pigmentos también están involucrados en mecanismos de autooxidación y fotooxidación.

Podemos distinguir dos clases de pigmentos naturales en el aceite de oliva [64]:

- Clorofilas y feofitinas
- Carotenoides

Las clorofilas y las feofitinas, son las responsables del color verde del aceite, en su estructura contienen cuatro grupos pirrólicos con un átomo de magnesio, en el caso de la clorofila, y de dos átomos de hidrógeno, en el de la feofitina. La fracción clorofilica la integran las clorofilas a y b y sus derivados libres de magnesio, las feofitinas a y b [5], tal como se observa en la Figura 2.20. En el aceite de oliva virgen se encuentra en mayor cantidad la feofitina-a (20-40%) y la clorofila-a (4-7%) [65]. En los aceites refinados el contenido en pigmentos disminuye notablemente. En ausencia de luz las clorofilas podrían actuar como antioxidantes débiles, pero en su presencia estos compuestos pueden ser fuertes promotores de oxidación [5].

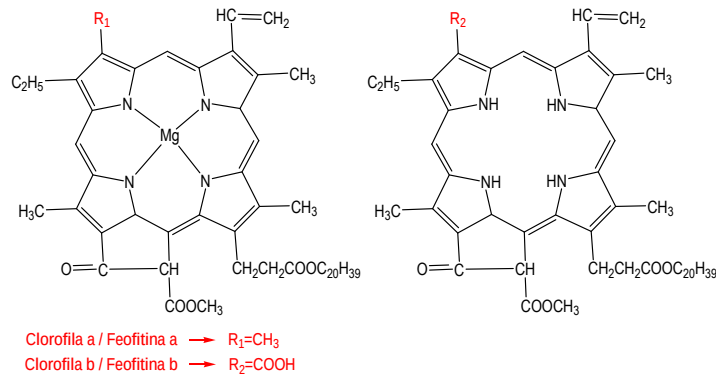


Figura 2.20. Estructura de los pigmentos clorofilicos y las feofitinas presentes en el aceite de oliva.

En cuanto a los carotenoides presentes en el aceite de oliva están: la luteína, el beta-caroteno, violaxantina y neoxantina. Químicamente se clasifican como terpenoides y se consideran biosintéticamente derivados del ácido mevalónico, intermediario metabólico que aporta la unidad básica estructural [31]. Están formados básicamente por 8

unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula, tal como se observa en la Figura 2.21.

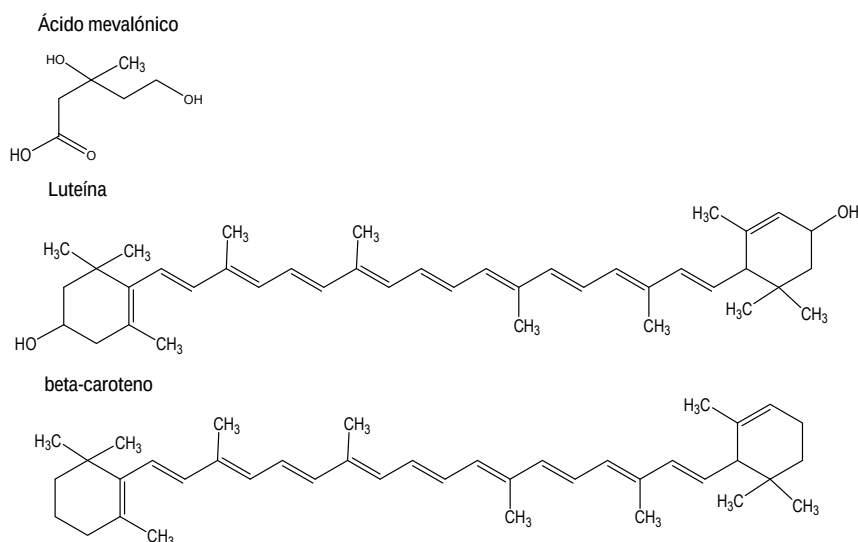


Figura 2.21. Estructura de los carotenoides presentes en el aceite de oliva.

2.4.2.3. Tocoferoles

Los tocoferoles, también integrantes de la fracción insaponificable, están en diferentes cantidades según la variedad de la aceituna y es mayor en los aceites vírgenes de gran calidad, mientras que en los aceites refinados disminuye notablemente su contenido. El más abundante entre ellos es el α -tocoferol (52-87%), también están presentes el β -tocoferol (15-20%) y γ -tocoferol (7-23%) [5]. Los tocoferoles contribuyen a dar estabilidad al aceite y tienen un papel biológico beneficioso como antioxidantes. Pueden capturar radicales libres gracias al grupo hidroxilo libre presente en el anillo aromático. El isómero más abundante, el alfa, es el que presenta una mayor actividad biológica como vitamina E.

La vitamina E, presenta ocho compuestos (tocolos), derivados de una estructura básica llamada “*tocol*”. Su estructura consta de dos partes primarias, un anillo complejo cromano, con un hidroxilo (6- hidroxicromano) y un larga cadena lateral de 16 carbonos constituidas por la unión de tres unidades de isopreno saturado (Figura 2.22.) [66].

Estos ocho tocolos se dividen en dos grupos fundamentales, cuatros tocoferoles (α -, β -, γ - y δ -) y cuatro tocotrienoles (α -, β -, γ - y δ -), se diferencian en la saturación de la cadena lateral, los primeros tienen una cadena saturada y los segundos una insaturada con tres dobles enlaces, estos últimos compuestos no se encuentran presentes en el aceite de oliva [67].

Los tocoferoles y tocotrienoles en su forma pura han sido descritos como sustancias viscosas de color amarillo pálido, que se descomponen fácilmente en presencia de luz, oxígeno, pH alcalino y ciertas trazas de minerales como hierro (Fe^{3+}) y cobre (Cu^{2+}). Insolubles en agua, medianamente solubles en solventes orgánicos y en aceites vegetales, se pueden aislar de la fracción insaponificable de estos últimos.

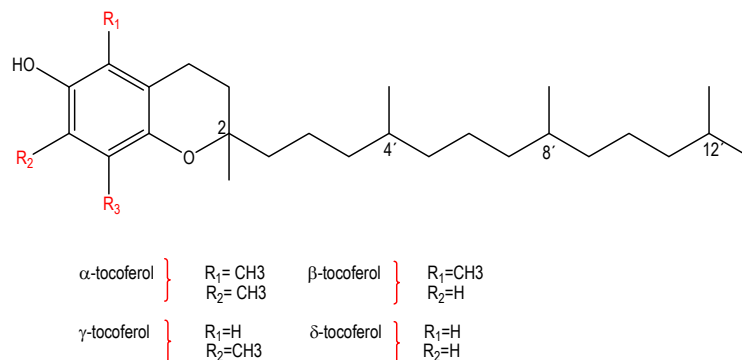


Figura 2.22. Estructura química de tocoferoles.

El contenido en tocoferol depende mucho de la variedad de aceituna. Sus concentraciones varían desde 5 a 300 mg/Kg. En aceites de oliva de buena calidad, el contenido suele estar entre los 100 a 300 mg/Kg. En los aceites comerciales de alta acidez es donde se han encontrado valores tan bajos como 5 mg/Kg. Otros autores lo establecen en el rango de 12 a 400 mg/Kg [31].

Se han realizado numerosas investigaciones de la presencia de tocoferoles en el aceite de oliva originario de diversos países y en todos los casos se observa un rango muy amplio de concentración. Psomiadou y col. [68], analizaron el contenido en α -tocoferol de 90 aceites de oliva virgen de diferentes variedades y de diferentes regiones de Grecia durante tres campañas consecutivas y por encima de un 60% de las muestras contenían más de 200 ppm de α - tocoferol siendo los valores extremos 98 y 370 ppm.

En Italia se ha hecho referencia a valores del contenido de α -tocoferol también muy variables y comprendidos entre 55 y 315 ppm [69].

Numerosos estudios realizados en España han mostrado un contenido medio de 230 ppm de α -tocoferol en aceites de la variedad Arbequina [70]. En aceites de la variedad Cornicabra el contenido en α -tocoferol cubre un rango entre 55 y 234 ppm, con un valor medio de 157 ppm, presentando sólo un 5% de los aceites analizados un contenido inferior a los 100 ppm [71]. Aceites de las variedades Hojiblanca y Picual tienen contenidos medios de α , β y γ -tocoferol de 187, 1.5 y 11 ppm para aceites de Hojiblanca y 208, 1.5 y 15 ppm para aceites de Picual [72].

2.4.2.4. Compuestos triterpénicos

El contenido total de alcoholes triterpénicos supone una de las fracciones más abundantes de la fracción insaponificable y pueden ser de estructura tetracíclica o pentacíclica, entre estos últimos, destacan dos alcoholes, el uvaol y el eritrodiol [31] (Figura 2.23.), y sus correspondientes ácidos, oleanólico y maslínico. La presencia de eritrodiol y uvaol es más abundante en la piel del fruto, y por lo tanto, estos compuestos están presentes en mayor concentración en el aceite de orujo [73]. El eritrodiol y uvaol se obtiene mediante procesos químicos de los restos de la aceituna una vez extraído el aceite mecánicamente. Así, su concentración varía entre 10 y 120 mg/Kg de aceite. El aceite de orujo debe refinarse y mezclarse con aceite de oliva virgen para que sea considerado apto para el consumo. La cantidad total de alcoholes triterpénicos es un parámetro de pureza para detectar la adulteración por presencia de aceite de orujo en el aceite de oliva virgen [74] y para ello la UE, el COI y el Codex Alimentarius de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y Agricultura (FAO), establecen límites en el porcentaje de estos compuestos presentes en el aceite de oliva.

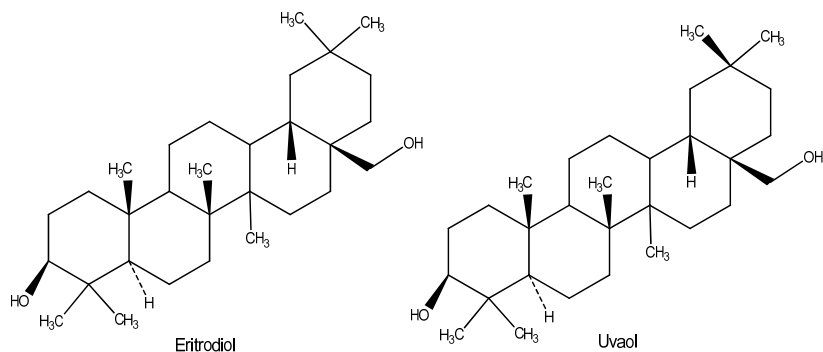


Figura 2.23. Estructura química de alcoholes triterpénicos del aceite de oliva.

2.4.2.5. Alcoholes alifáticos

Esta fracción está constituida por alcoholes saturados de cadena lineal con número par de átomos de carbono y con longitudes entre 18 y 28 átomos de carbono. Los mayoritarios son el hexacosanol, octacosanol y tetracosanol. También pueden estar presentes en forma de trazas el tricosanol, pentacosanol y heptacosanol [29]. Estos alcoholes, al igual que los esteroides y los alcoholes triterpénicos, pueden unirse con ácidos grasos y constituyen los ésteres no glicéridos.

2.4.2.6. Esteroides

Los esteroides comprenden un amplio grupo de compuestos que presentan una estructura molecular análoga, que deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno. Pueden estar presentes en su forma libre o esterificada con ácidos grasos. La diferencia entre los diferentes esteroides está en el número y posición de los dobles enlaces y en la naturaleza de la cadena lateral.

Dentro de la fracción de esteroides del aceite de oliva, el más abundante de la fracción es el β -sitosterol (75-90%), el δ -5-avenasterol (5-36%) y el campesterol (aprox. 3%) [5,

75], cuyas estructuras químicas aparecen en la Figura 2.24. Se encuentran otros esteroides en menor proporción como el estigmasterol, el propio colesterol, δ -7-estigmasterol y δ -7-avenasterol. Son compuestos tetracíclicos cuya biosíntesis comienza con el escualeno [74].

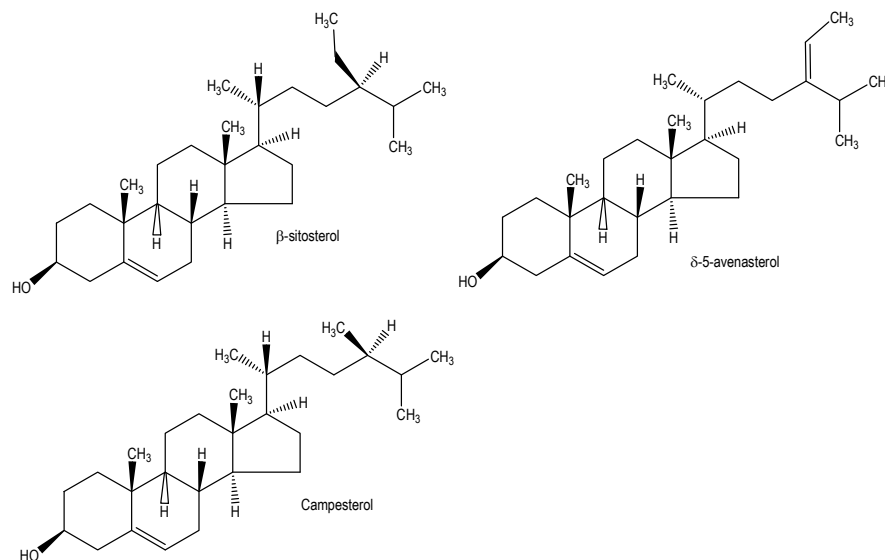


Figura 2.24. Estructura de los principales esteroides presentes en el aceite de oliva.

EL contenido total de esteroides en el aceite de oliva oscila en el rango de 1130-2650 mg/Kg [74]. Estos valores pueden ser hasta tres veces más altos. Se relaciona el contenido total de esteroides con la acidez libre: los aceites con un porcentaje alto de ácidos grasos libres, también tienen un alto valor de esteroides totales.

Los límites que establece el Reglamento (CEE) n° 2568/91 modificados en el Reglamento (CE) n° 282/98 para los niveles de esteroides que pueden presentar los distintos tipos de aceite de oliva virgen son: colesterol $\leq 0.5\%$, brasicasterol $< 0.1\%$, campesterol $\leq 4.0\%$, estigmasterol $\leq 4.0\%$, β -sitosterol $\leq 93\%$, δ -7-estigmasterol $\leq 0.5\%$ y esteroides totales ≥ 1000 mg/Kg.

2.4.2.7. Componentes volátiles

Son compuestos de bajo peso molecular (menos de 300 Da) que se evaporan a temperatura ambiente y de los que se han identificado más de 100 diferentes en el aceite de oliva [5, 76]. Su formación está relacionada con procesos enzimáticos que contribuyen al aroma y a la calidad del aceite de oliva virgen [77]. Al igual que ocurre con otros compuestos, su presencia en los aceites depende de la variedad, condiciones climáticas y calidad del aceite. Dentro de este grupo hay alcoholes, ésteres, fenoles, derivados de fenoles y aldehídos, entre otros compuestos [5].

La fracción volátil del aceite de oliva virgen está compuesta principalmente por numerosos aldehídos, alcoholes, ésteres, cetonas e hidrocarburos, la mayoría de los cuales han sido identificados mediante GC-MS [78]. Destacan el hexanal, (*E*)-2-hexenal, hexanol y 3-metilbutanol, que se encuentran en la mayoría de los aceites de oliva de Europa [77] y son responsables de los sabores y aromas afrutados de algunos aceites [78].

El perfil de compuestos volátiles detectado en un aceite de oliva varía en función de la calidad sensorial del mismo. De tal forma que en la fracción volátil de los aceites obtenidos a partir de frutos sanos y frescos mediante técnicas adecuadas de extracción, predominan principalmente los aldehídos, alcoholes y ésteres de seis átomos de carbono (C6), además de diversos compuestos carbonílicos de cinco átomos de carbono (C5), los cuales proceden de la oxidación enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados a través de la denominada “ruta de la lipoxigenasa” (LOX) [79], y que son los principales responsables de las notas sensoriales verdes y frutadas propias del aceite de oliva virgen de alta calidad.

Por otro lado, la fracción volátil de los aceites de oliva que presentan defectos sensoriales se caracteriza por la menor concentración o ausencia total de los productos de la ruta LOX, así como por la elevada presencia de aldehídos insaturados de siete a

once átomos de carbono (C7-C11), dienales de seis a diez átomos de carbono (C6-C10), compuestos carbonílicos de ocho átomos de carbono (C8) o aldehídos y alcoholes ramificados de cinco átomos de carbono [79], todos ellos caracterizados por poseer umbrales de detección bajos y por ser responsables de los atributos sensoriales negativos.

Biosíntesis de los compuestos volátiles

La presencia de compuestos volátiles es apenas imperceptible durante el crecimiento de la aceituna hasta que se inicia la fase climatérica, en la cual aumenta la producción de etileno, lo que implica numerosos cambios físicos, químicos y bioquímicos en el fruto, además del incremento de la síntesis proteica, acídica y un aumento en la actividad de las enzimas presentes [80], factores de los que posteriormente dependerá la presencia de compuestos volátiles en el aceite obtenido.

Aunque existen una serie de volátiles presentes en el aceite de oliva virgen que se encuentran inicialmente de forma natural en el fruto intacto, los principales compuestos responsables del aroma de este producto son metabolitos secundarios, cuya formación comienza inmediatamente después de la ruptura del fruto y continúa durante el batido de la pasta de aceituna, debido a la actividad de diversas enzimas que actúan en presencia de oxígeno [81] y que utilizan como principales sustratos los ácidos grasos y algunos aminoácidos, como la leucina, la isoleucina y la valina.

Las principales rutas bioquímicas implicadas en la síntesis de los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen de calidad son las que se resumen a continuación:

- *Metabolismo de ácidos grasos.* Durante la maduración del fruto se produce la conversión de algunos ácidos grasos en cetonas, ésteres y alcoholes, que posteriormente forman parte del perfil aromático del aceite de oliva virgen.

- *Ruta de la Lipoxigenasa (LOX)*. Como se ha comentado previamente, los compuestos volátiles C6, presentes no sólo están en el aroma del aceite de oliva virgen sino también en numerosas frutas y vegetales, se generan a través de una serie de reacciones enzimáticas encadenadas que conforman la denominada ruta LOX y que utiliza como sustratos, los ácidos grasos linoleico y linolénico [77]. La Figura 2.25. representa de forma esquemática los principales productos obtenidos mediante esta ruta, así como las enzimas implicadas en la misma.

La ruptura de los tejidos de la aceituna durante la etapa de molienda permite la liberación de las enzimas implicadas en esta ruta bioquímica, que comienza tal y como puede observarse en la Figura 2.25., a través de la enzima lipoxigenasa (LOX), la cual cataliza la dioxigenación de los ácidos grasos poliinsaturados que presentan la estructura (Z)-1,4- pentadieno en su cadena carbonada originando los correspondientes hidroperóxidos. Estudios recientes han puesto en evidencia la especificidad de la enzima LOX, presente en la pulpa de aceituna, por la posición 13 de los ácidos linoleico y linolénico, obteniéndose entre un 75-90% de 13-hidroperóxidos, además de una actividad dos veces superior sobre el ácido linolénico respecto del linoleico [78], lo que explica que los volátiles insaturados C6 sean los componentes mayoritarios presentes en el aroma del aceite de oliva virgen de calidad.

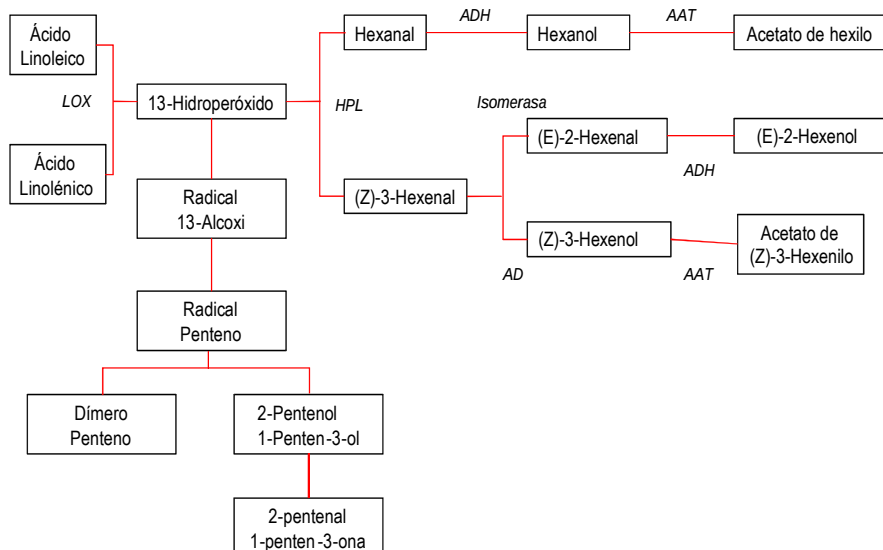


Figura 2.25. Ruta de la lipoxigenasa, responsable de la formación de los compuestos volátiles C6 y C5 presentes en el aroma de los aceites de oliva virgen de calidad [77].

La posterior reducción de los aldehídos C6 es llevada a cabo por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Figura 2.25.). En la pulpa de aceituna se han aislado e identificado tres isoenzimas distintas en función de su dependencia del nucleótido deshidrogenasa (NADH) o Nicotinamina-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), estableciéndose que según sus características cinéticas, que la única isoenzima envuelta en la biogénesis de los alcoholes C6 es la ADH NAPH-dependiente, que presenta una actividad 20 veces superior a la NADH-dependiente [80].

La última etapa de la ruta LOX implica la formación de los correspondientes ésteres volátiles de los alcoholes saturados e insaturados C6, que se forman mediante la esterificación de los alcoholes con derivados acetil-CoA, gracias a la acción de la enzima alcohol acetiltransferasa (AAT). Esta enzima no actúa sobre alcoholes de cadena corta, como el metanol y el etanol, mostrando una actividad baja sobre el butanol y el 3-metilbutanol [78], por lo que la falta de actividad de esta enzima sobre los alcoholes de cadena corta explica la escasez de los acetatos de hexilo y hexenilo que se observa en

el aroma del aceite de oliva virgen [82]. Existe una rama adicional en la ruta LOX que tiene como sustrato específico el 13-hidroperóxido del ácido linolénico, a través de la cual se generan dímeros de penteno y alcoholes C5, como el 1-penten-3-ol y el 2-pentenol. La posterior actividad de la ADH podría ser la responsable de la formación de los correspondientes aldehídos C5 que también se han encontrado en el aroma del aceite de oliva virgen [83].

Los aromas también provienen de la acumulación de otras posibles fermentaciones o la conversión de algunos aminoácidos o de los procesos oxidativos, pero generalmente se relacionan con el mal sabor de aceite de oliva virgen [77]. En la Tabla 2.9. se resumen las notas sensoriales características de los principales compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen extra, determinados por diversos autores y recogidos en bibliografía.

Tabla 2.9. Notas sensoriales de los principales compuestos volátiles C6 y C5 presentes en el aroma del aceite de oliva por diversos autores.

Compuesto	Nota aromática	Referencia
Aldehídos		
2-metilbutanal	Malta	[84]
3-metilbutanal	Malta	[84]
(E)-2-metil-2-butenal	Frutos verdes	[85]
(E)-2-pentenal	Verde, manzana, amargo, almendra amarga	[86, 87]
Hexanal	Verde-dulce, manzana verde, hierba	[86, 87]
(E)-2-hexenal	Verde, manzana, almendras amargas Verde astringente	[86, 88]
(E)-2-heptenal	Oxidado, pungente, grasoso	[86]
2,4-heptadienal	Rancio	[86]
(E)-2-octenal	Herbáceo, picante	[86]
Alcoholes		
2-metil-1-propanol	Notas verdes	[89]
3-metilbutanol	Dulce, wiski	[86]
2-metil-3-buten-2-ol	Tierra, grasoso	[85]
1-pentanol	Frutas, balsámico	[90]
1-penten-3-ol	Mantequilla, frutado, verde paja, césped, tierra mojada	[90]
(Z)-2-pentanol	Almendra, plátano, fruta, hierba verde	[90]
Hexanol	Frutas, banana suave Césped recién cortado	[88]
(Z)-2-hexenal	Fruta verde	[88]
(E)-2-hexenal	Manzana verde, pasto verde, dulce, almendra amarga	[84, 86, 87]
(Z)-3-hexenal	Hoja verde	[84, 86, 87, 87]
Esteroles		
Butyl acetato	Verde picante	[86]
2-metil acetato	Frutos verdes, plátano	[85]
3-metil-2-butenyl acetato	Picante	
Acetato (Z)-3-hexenilo	Banana verde, floral, frutado	[84, 87]
Cetonas		
2-butanona	Afrutado	[86]
1-penten-3-ona	Verde, punzante, picante	[90]
4-metil-2-pentanona	Frutos rojos, fresa, dulce	[85]
2-heptanone	Fruta dulce	[85]
6-metil-5-hepten-2-ona	Verde	[86]
2-octanona	Verde	[86]
2-nonanona	Floral, afrutado	[85]
Hidrocarburos aromáticos		
Etilbenzeno	Amargo	[89]
Hidrocarburos		
Octano	Dulce	[86, 89]

2.5. Contaminantes del aceite de oliva

La presencia de contaminantes orgánicos en la aceituna que llega a la almazara es un hecho constatado en estudios realizados por diferentes investigadores [91, 92]. Los contaminantes orgánicos encontrados son fundamentalmente residuos de plaguicidas, productos de degradación de los mismos, e hidrocarburos aromáticos. Estos compuestos, que se incorporan como componentes ajenos a la materia prima (aceituna) y, por tanto, aparecen en el producto elaborado (aceite), se conocen con la denominación genérica de '*Xenobióticos*'.

Los plaguicidas y sus productos de degradación proceden fundamentalmente de su empleo en el olivar en las prácticas agrícolas habituales de tratamiento contra las plagas (herbicidas, insecticidas, etc.). Los hidrocarburos aromáticos son compuestos que se encuentran en los combustibles fósiles como gasolina y gasóleo (hidrocarburos aromáticos monocíclicos, BTEXS) [93] y también se forman durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, la basura y otras sustancias orgánicas como, son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [92].

2.5.1. Plaguicidas

El incremento en la producción y uso de compuestos químicos en la agricultura, en los últimos cien años ha dado origen a una preocupación creciente, sobre el efecto que dichos compuestos pueden tener sobre los ecosistemas, terrestre y acuático. Debido a sus características químicas, los plaguicidas son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada. La aplicación de plaguicidas sintéticos ha sido una práctica rutinaria en la agricultura en los últimos cincuenta años. El uso indiscriminado que en el pasado se ha dado a estos compuestos, ha dado lugar que en la actualidad se detecten residuos de éstos en el ambiente y se asocien con riesgo potencial a la salud pública [94].

2.5.2. Residuos de hidrocarburos aromáticos monocíclicos

Los MAHs, cuyo principal grupo son los BTEXS (benceno, tolueno, etilbenceno, isómeros de xileno y estireno) (Figura 2.26.), están presentes en los productos derivados del petróleo, como las gasolinas. Los BTEXS son muy solubles en aceites y grasas, a los que pueden llegar fácilmente por contaminación ambiental. Dada su alta volatilidad, se encuentran en el aceite de oliva virgen, suelen ser muy superiores a los encontrados en otros aceites que han sido sometidos a procesos de refinado [95].

Para la detección rápida y fiable de BTEXS en muestras de aceite de oliva, se emplea el acoplamiento directo de espacio de cabeza-espectrometría de masas (HS-MS/MS) o bien espacio de cabeza – cromatografía de gases/espectrometría de masas (HS-GC-MS) [76, 95, 96].

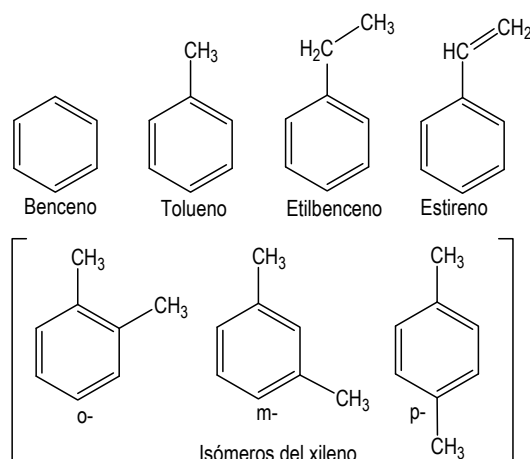


Figura 2.26. Estructura benceno, tolueno, etilbenceno, estireno e isómeros del xileno.

2.5.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Son un grupo de compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados. En la Figura 2.27. se muestran las estructuras químicas de los 16 PAHs que la US-EPA (Agencia para la protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos)

incluyó en su lista de contaminantes prioritarios. Por lo general, estos compuestos se forman por la combustión incompleta de materiales orgánicos a través de procesos naturales o antropogénicos tales como los incendios forestales, las calefacciones, los vehículos, las incineradoras, la producción de alquitrán y asfalto, así como algunas técnicas utilizadas en el procesamiento de alimentos como el ahumado o el tostado, e incluso en algunos métodos empleados para el cocinado de los alimentos. Debido a la existencia de una gran variedad de fuentes de estos compuestos, los PAHs han sido detectados en el medio ambiente así como en los alimentos. Muchos de estos compuestos despiertan preocupación para la salud pública ya que son conocidos por su posible carácter carcinogénico y mutagénico.

La mayoría de los PAHs no tienen un uso comercial aunque algunos, como el naftaleno, el antraceno y el fenantreno, se emplean como materias primas en la fabricación de tintes, celuloide, lubricantes, plásticos e insecticidas. Las cantidades usadas en la industria son pequeñas por lo que se considera que la mayor fuente de residuos de PAHs detectados en el medio ambiente, proviene de la combustión incompleta de materia orgánica.

Entre las distintas rutas de la exposición humana a los PAHs, los alimentos son una de las principales vías de exposición a estos compuestos. Se ha estimado que la ingesta diaria de PAHs carcinogénicos está alrededor de los 3 $\mu\text{g}/\text{día}$, que es unas veinte veces mayor que la exposición por la vía inhalatoria (0,13 $\mu\text{g}/\text{día}$) y quinientas veces mayor que a través del agua (0,006 $\mu\text{g}/\text{día}$) [34]. Por consiguiente, es muy importante desarrollar métodos analíticos sencillos y precisos que permitan detectar estos compuestos.

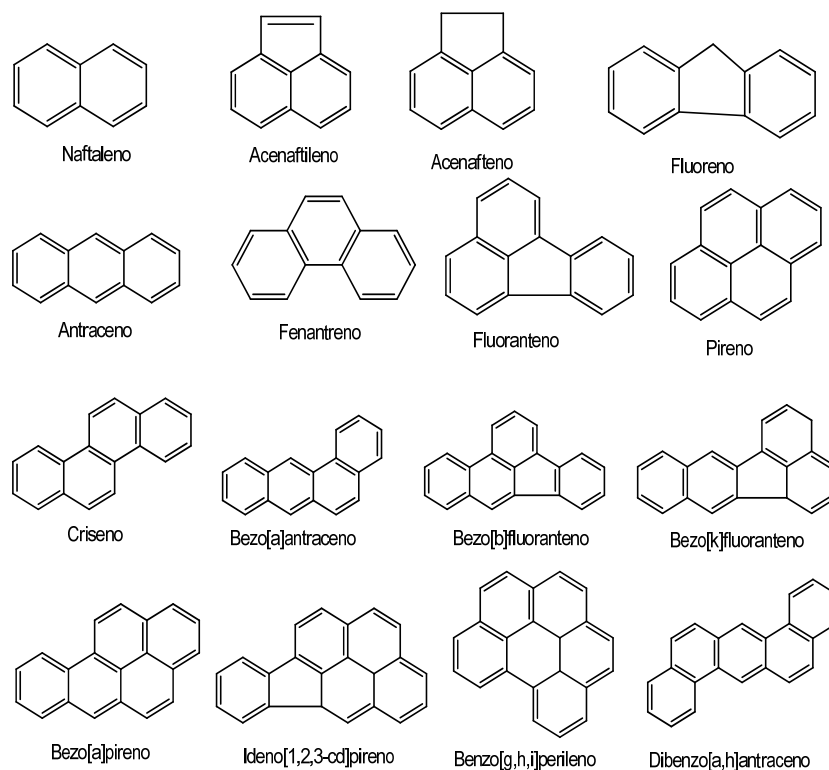


Figura 2.27. Estructura química de los hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Los PAHs son compuestos apolares muy hidrofóbicos, es decir, presentan una alta solubilidad en disolventes orgánicos y son muy poco solubles en agua. La aparición de residuos de PAHs en los alimentos está muy influenciada por estas características físico-químicas. Así, estos compuestos no tienden a acumularse en alimentos con un alto contenido acuoso. Los tratamientos térmicos de los alimentos, como es la fritura o el asado, o procesos como el ahumado y el desecado son las principales fuentes de contaminación por PAHs en los alimentos [97, 98]. Los aceites vegetales y las grasas son otra fuente importante de estos compuestos en la dieta, debido al secado de las semillas empleando gases de combustión [99].

El Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH) dictaminó en el año 2002, que algunos PAHs son cancerígenos genotóxicos. El benzo[a]pireno (BaP) puede utilizarse como marcador de la presencia y efecto de los PAHs cancerígenos en los alimentos. A fin de proteger la salud pública la UE, en el Reglamento (CE) N° 208/2005 de la Comisión, ha fijado niveles máximos de BaP para ciertos alimentos como aceites y grasas destinados al consumo humano (2 µg/Kg peso fresco), carnes y pescados (2-10 µg/Kg peso fresco) y en productos alimenticios destinados a lactantes y niños de corta edad (1 µg/Kg peso fresco).

El proceso de extracción del aceite de oliva es el principal punto crítico de contaminación por PAHs, por la contaminación debido mayoritariamente a la contaminación ambiental de las almazaras, así como la producida por el funcionamiento de las calderas [92].

La presencia de PAHs, no procedentes de la propia biosíntesis del olivo, se detectó en aceite de orujo de oliva en el año 2001 en España [100]. Como consecuencia de ello, se estableció un límite máximo tolerable igual o menor a 2 µg/Kg para BaP, benzo(e)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno (1,2,3-c,d)pireno. Mediante la Resolución N°RES-1/93-IV/05, del COI del Comité de Química Oleícola y Elaboración de Normas, en el marco de la 85ª Reunión del Consejo, se consideró la necesidad de establecer el límite máximo de 2µg/Kg de contenido de BaP, para restablecer la confianza de los consumidores respecto al aceite de orujo de oliva y al aceite de oliva.

2.5.4. Metales

La contaminación metálica fue uno de los problemas que se plantearon en el aceite de oliva a causas del revestimiento de los depósitos metálicos de almacenamiento con resina epóxi [101]. El hierro y el cobre son catalizadores de la oxidación, que altera gravemente la estabilidad del aceite y sus características organolépticas, además el hierro durante el refinado produce alteraciones indeseables de color difíciles de corregir. Para estos parámetros se ha producido una separación clara entre la norma comercial del COI que sí regula un máximo de 3 mg/Kg para el hierro y de 0,1 mg/Kg para el

cobre, y la normativa de la UE que considera sólo que los metales que pueden llegar a tener una importancia toxicológica son como el plomo y arsénico.

En estudios recientes de monitoreo de residuos de metales en aceites de oliva, de diferentes procedencias (España y Marruecos), se ha encontrado que la presencia de metales procedentes de Marruecos es superior a los aceites de oliva españoles, sobre todo en el caso del plomo, llegándose a encontrar unos niveles superiores a los permitidos en el COI [102].

La composición natural de la aceituna, la contaminación del suelo, el uso de fertilizantes, el proceso de extracción o carreteras cercanas a las plantaciones, son las principales fuentes de metales en los aceites de oliva. El nivel de trazas de metales en el aceite de oliva presenta influencia sobre los parámetros de calidad ya que catalizan los procesos de oxidación del aceite, resultado nocivos para la salud humana [103].

Los metales tienen efectos negativos sobre la estabilidad oxidativa del aceite de oliva. La oxidación conduce al desarrollo de olores y sabores desagradables, y es por tanto, una de las razones principales de deterioro de los aceites de oliva.

Los factores que más afectan a la velocidad de oxidación son el grado de insaturación del aceite, la cantidad de oxígeno, la temperatura, la luz y la presencia de metales (principalmente metales tales como Fe y Cu) [104].

2.6. Plaguicidas

Por "Plaguicida" se entiende *"cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos"* [105], tal como lo menciona el B.O.E. 24 enero 1984. Real Decreto 30 noviembre 1983, núm. 3349/83:

- Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción
- Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos
- Conservar los productos vegetales, incluida la protección de las maderas
- Destruir los vegetales indeseables
- Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos
- Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales

El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha, para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte. La normativa también no contempla los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos veterinarios⁴.

El control de plagas y enfermedades, así como de las malas hierbas, requiere de la utilización de productos fitosanitarios, como insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc. Algunos de estos productos, se degradan por vía hidrolítica o por acción de la luz solar y acción fotolítica, dando productos finales inocuos o no, pero que pueden ser retenidos por el suelo. Este mismo fenómeno ocurre con los productos no degradados que pueden retenerse en el suelo y contaminar no sólo las aguas, sino también al suelo en el momento de la recolección, con lo que, al mezclarse la tierra con la aceituna, ésta se contamina [106].

⁴ Por "productos agrícolas" se entienden productos como cereales en bruto, remolacha azucarera y semilla de algodón que, en cuanto tales, no se consideran alimentos.

Para esta tesis doctoral se han elegido numerosos grupos de plaguicidas que se emplean en el cultivo del olivar. El nombre de estos plaguicidas se han mantenido en inglés a lo largo de toda esta tesis por conveniencia.

Los plaguicidas se pueden clasificar de diversas maneras, siendo una de las más utilizadas, la que se muestra en la Tabla 2.10. En esta clasificación se ha empleado el criterio de la función que desempeñan.

Las dos características más importantes que controlan la migración de plaguicidas en aguas y suelos son su movilidad y persistencia. Los plaguicidas deben ser suficientemente móviles como para alcanzar su objetivo y suficientemente persistentes como para eliminar el organismo específicamente atacado [107].

Un elevado coeficiente de adsorción indica que el plaguicida va a ser retenido por el suelo y la materia orgánica con la que puede formar diferentes productos, mientras que si la solubilidad es alta, el compuesto podrá ser transportado a otros sistemas en los que estará inmerso en la disolución acuosa (lixiviación de plaguicidas). Por otra parte, el valor del coeficiente de reparto octanol:agua (K_{ow}), analiza el potencial de bioacumulación del plaguicida en el suelo [108].

Tabla 2.10. Clasificación de plaguicidas.

<i>Plaguicidas</i>	<i>Acción específica</i>
Insecticida	Control de insectos
Acaricida	Control de arañas
Fungicida	Control de hongos
Desinfectante y bactericida	Control de bacterias
Herbicida	Control de malas hierbas
Fitorreguladores y productos afines	Estimula y retarda el crecimiento de algunos insectos
Rodenticida y varios	Control de roedores
Atrayente	Atrae insectos

Nematicida	Agentes químicos que se usan para combatir los nematodos.

Desde el punto de vista de su estructura química existe una gran variedad, pudiéndose clasificar los plaguicidas como se detalla a continuación:

2.6.1. Insecticidas y acaricidas

2.6.1.1. Carbámicos

Los también llamados insecticidas carbamato presentan un grupo funcional formado por un éster carbamato. En este grupo se incluyen entre otros el aldicarb, carbofuran (Furadan), fenoxycarb, carbaryl (Sevin) Figura 2.28., ethienocarb, y fenobucarb.

Los carbamatos se degradan con relativa rapidez y tienen una limitada acción residual. Su solubilidad es también limitada pero es mucho mayor que la de los organoclorados.

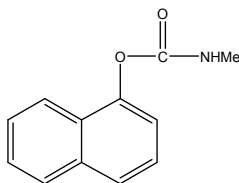


Figura 2.28. Estructura de carbaryl.

Son muy poco solubles en agua y quedan retenidos en las capas superficiales del suelo antes de desaparecer, por lo que no es muy probable que lleguen a alcanzar el acuífero.

2.6.1.2. Organofosforados

Los organofosforados son un grupo de productos químicos usados como plaguicidas artificiales aplicados para controlar las poblaciones de plagas de insectos. La segunda guerra mundial trajo una gran revolución de la industria química. En dicho marco aparecieron los organofosforados con función exclusivamente militar (gases neurotóxicos). Después de la guerra, aparecieron en los años 50 el parathion y el

malathion, organofosforados que se consolidaron como insecticidas principalmente agrícolas y posteriormente, su uso se incrementó significativamente con la prohibición del uso de los organoclorados.

Los insecticidas organofosforados también inhiben esta enzima, aunque lo hacen de manera irreversible, y por lo tanto causan un envenenamiento y un síndrome colinérgico mucho más severo.

Sus características principales son su alta toxicidad, su baja estabilidad química y su nula acumulación en los tejidos, característica ésta, que los posiciona en ventaja con respecto a los organoclorados de baja degradabilidad y gran bioacumulación. En general se hidrolizan fácilmente, tanto por vía enzimática como no enzimática. La estabilidad frente a la acción hidrolítica sobre estos compuestos aumenta, según la naturaleza de los enlaces, en el orden: anhídrido o halogenuro, alcohoxi y amido, oxifosfatos, tiofosfatos y fosfonatos. Los tiofosfatos son más estables que los oxifosfatos debido a la mayor electroafinidad del átomo de oxígeno. También se producen reacciones fotoinducidas, como es la oxidación de grupos mercapto a sulfóxidos y sulfonas. Además, la radiación ultravioleta es capaz de producir isomerizaciones de los ésteres fosfóricos para dar derivados más tóxicos.

La oxidación de tiofosfatos en oxifosfatos incrementa la toxicidad, esta oxidación es espontánea en el dimethoate y se produce en el malathion, por la acción de agentes oxidantes tales como el ácido nítrico o acético. Otra forma de degradación de algunos compuestos de fósforo es la deshidrohalogenación. Se conoce este proceso para el dipterex (trichlorfon) dando DDVP (dichlorvos), que tiene lugar en condiciones de pH de suelo alcalinos, el producto de degradación en este caso, el DDVP, es mucho más tóxico que el compuesto original [109]. La velocidad de degradación de estos compuestos es muy variable. Como ejemplo, uno de los plaguicidas de este grupo, el parathion, se hidroliza lentamente, siendo degradado alrededor de un 50% del producto en 120 días a pH neutro. El DDVP se degrada en un 50% en ocho horas a pH neutro

[110]. En esta tesis de investigación se han estudiado los organofosforados incluidos en la Figura 2.29.

2.6.1.3. Piretroides

El pelitre ha sido uno de los derivados vegetales más empleado como insecticida, especialmente en aplicaciones domésticas, pero su utilización en agricultura ha sido más bien escasa por carecer de la requerida estabilidad. La investigación realizada sobre los constituyentes del pelitre (las denominadas piretrinas, en general) en el transcurso de los últimos veinte años, ha conducido al desarrollo de una serie de nuevos productos, a los que se ha denominado de forma genérica piretroides.

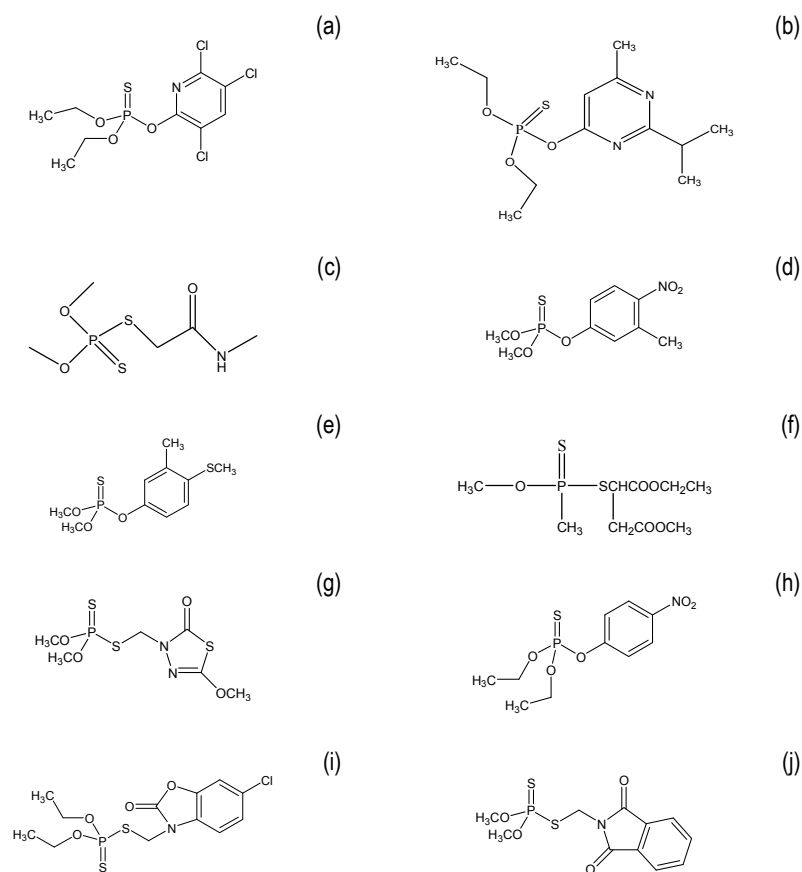


Figura 2.29. Estructura de los principales insecticidas organofosforados: (a) chlorpirifos, (b) diazinon, (c) dimethoate, (d) fenitrothion, (e) malathion, (f) methidathion, (g) parathion ethyl, (h) phosalone, (i) phosmet y (j) pirimiphos methyl.

En el suelo, se ha visto que piretroides marcados con carbono 14, alcanzan niveles del 90% de degradación a los 90 días de su incorporación en medios aerobios y anaerobios, siendo el 10% restante compuestos distintos a los piretroides [110]. En las plantas, estudios realizados sobre varios cultivos, indican que los piretroides, una vez en las hojas, sufren una isomerización, cis-trans y el producto absorbido produce hidrox-

ésteres, sus glicóxidos y ácido 3-fenoxibenzoico. En general son moléculas bastante estables en la atmósfera y a la exposición solar [34]. En la Figura 2.30. se observa la estructura química del fenpropathrin.

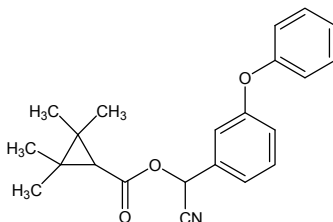


Figura 2.30. Estructura de fenpropathrin (piretroides).

2.6.2. Fungicidas

Los fungicidas se utilizan para el control de enfermedades producidas por hongos en semillas, plantas y frutos. Se aplican tanto en el campo como para la protección durante el almacenamiento, el transporte y la comercialización. Los fungicidas se pueden clasificar en dos grandes grupos: inorgánicos y orgánicos. Los primeros son, principalmente, el azufre, los polisulfuros y algunas sales de cobre. Los fungicidas orgánicos se empezaron a desarrollar en 1934, siendo en general, más efectivos y menos nocivos que los inorgánicos. Los fungicidas orgánicos presentan unas estructuras químicas muy heterogéneas. Entre estos compuestos se encuentran los tiocarbamatos, los azoles, los bencimidazoles y las dicarboximidas aunque existen más clases de fungicidas. En la Figura 2.31. se muestra la estructura química del procymidone.

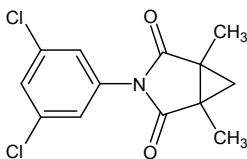


Figura 2.31. Estructura de procymidone.

La familia de los azoles son también muy conocidos por su alto poder fúngico, Figura 2.32.

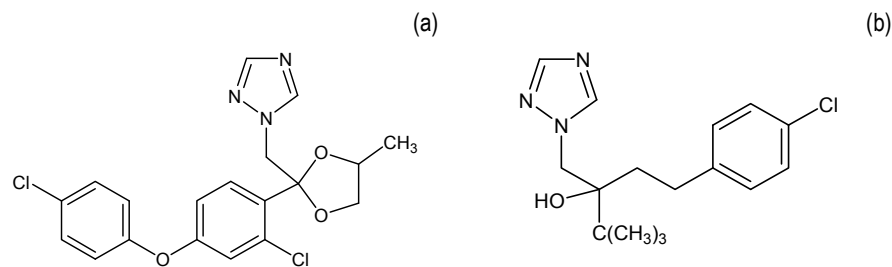


Figura 2.32. Estructura de (a) difeconazole y (b) tebuconazole.

2.6.3. Herbicidas

2.6.3.1. Triazoles

Sólo un miembro de este grupo ha sido considerado, el amitrole, cuya estructura se muestra en la Figura 2.33. Es de bajo peso molecular, sólido, polar y anfótero. Se emplea en el olivar, es un herbicida no selectivo y por lo tanto se utiliza en los huertos y la industria para el control total de malezas. Se aplica a veces en cantidades muy altas cuando se utiliza para el control total de malezas. El modo de acción del compuesto está basado en la inhibición de la formación de clorofila, el amitrole no absorbe la radiación y su fotodegradación no es fácil. Además, es estable frente a fenómenos de hidrólisis. La polaridad del compuesto hace que su acción sea sistémica, tanto en el floema, como en el xilema de las plantas. Su polaridad hace débil su absorción en el suelo y por lo tanto está presente en los lixiviados, en las condiciones adecuadas. Es degradado por los microorganismos del suelo y por lo tanto no es persistente. El herbicida se metaboliza fácilmente en las plantas, aunque no se conocen productos de transformación estables.

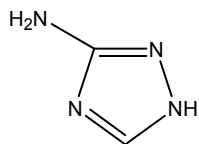


Figura 2.33. Estructura del amitrole.

2.6.3.2. 1,3,5-Triazinas

El grupo de herbicidas triazinas es uno de los más conocidos y utilizados desde hace más de 40 años. Su actividad como herbicida fue descubierto en 1952 por JR Geigy en Suiza, y desde ese momento se evalúa el efecto de muchas variaciones en los sustituyentes, de las que se han descubierto una serie de sustancias activas. Actualmente hay 14 triazinas en uso comercial. La característica estructural común de las triazinas, tal como se observa en la Figura 2.34, es la estabilidad del anillo 1,3,5-triazina. La actividad herbicida se encontró que corresponde a los compuestos con cloro, metílico o un grupo metoxi. Varias cadenas laterales de N-alkiloamino se han introducido y éstos no sólo afectan a la actividad biológica sino que también afectan a la tasa de degradación, especialmente en suelos.

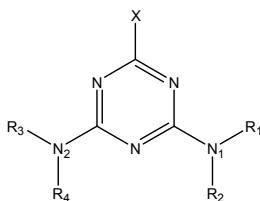


Figura 2.34. Estructura general de las triazinas.

Las triazinas de uso corriente son generalmente 4,6-diaminotriazinas con 2-cloro, 2-metoxi o grupos de 2-metílico. Estos compuestos son inhibidores de la fotosíntesis que son absorbidos por las hojas y las raíces, son trasladadas por el xilema y se acumulan en los meristemas apicales. En la Tabla 2.11., se muestran las triazinas estudiadas en este trabajo.

Tabla 2.11. Fórmula general y grupos sustituyentes de las triazinas y sus derivados.

	Nombre	X	$\begin{array}{c} \text{N}_1 \\ \swarrow \quad \searrow \\ \text{R}_1 \quad \text{R}_2 \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{N}_2 \\ \swarrow \quad \searrow \\ \text{R}_3 \quad \text{R}_4 \end{array}$	
1	Ametryn	SCH ₃	H	C ₂ H ₅	H	CH(CH ₃) ₂
2	Atrazine	Cl	H	C ₂ H ₅	H	CH(CH ₃) ₂
3	Cyanazine	Cl	H	C ₂ H ₅	H	C(CH ₃) ₂ CN
4	Desmetryn	SCH ₃	H	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂
5	Dimethametryn	SCH ₃	H	C ₂ H ₅	H	CH ₂ (CH ₃) ₃
6	Propazine	Cl	H	CH(CH ₃) ₂	H	CH(CH ₃) ₂
7	Simazine	Cl	H	C ₂ H ₅	H	C ₂ H ₅
8	Terbutylazine	Cl	H	C ₂ H ₅	H	C(CH ₃) ₃
9	Terbutryn	SCH ₃	H	C ₂ H ₅	H	C(CH ₃) ₃
10	Terbumeton	OCH ₃	H	C ₂ H ₅	H	C(CH ₃) ₃

2.6.3.3. Dinitroanilinas

Se empezaron a comercializar en 1961. El compuesto más conocido es la trifluralina, un herbicida selectivo aunque de amplio espectro y bien tolerado por cultivos como el girasol, el algodón o la soja. Su vida media en el suelo es de 3 - 5 meses. Se absorbe por las raíces, donde permanece fijada en la planta. Inhibe la división celular, y las raíces se atrofian. Es especialmente eficaz en las primeras fases de desarrollo de las malas hierbas, y afecta principalmente a las gramíneas (excepto algunas avenas silvestres) y dicotiledóneas anuales. Es menos eficaz sobre crucíferas y compuestas. Otras dinitroanilinas empleadas como herbicidas son el orizalin, el pendimethalín, etc. En la Figura 2.35, se muestran las estructuras químicas.

(a)

(b)

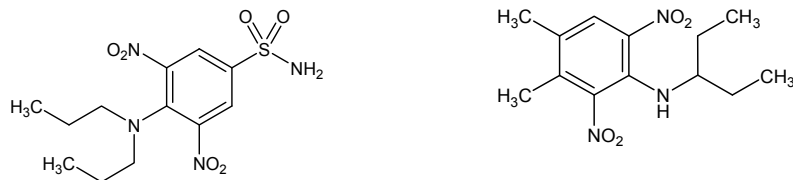


Figura 2.35. Estructura de (a) orizalin y (b) pendimethalin.

2.6.3.4. Ureas sustituidas

Son derivados de la urea ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$), un conocido fertilizante, al que se le sustituyen tres de sus hidrógenos por diversos radicales. Normalmente se aplican al suelo, aunque también presentan actividad foliar, con la ayuda de surfactantes. Su persistencia en el suelo es muy variable. Además de inhibir la fotosíntesis, pueden destruir membranas celulares. No afectan a los órganos de reserva de las especies perennes. Las más conocidas son el diuron y el linuron. Otros ejemplos son: cloroxuron, fluometuron, siduron, fenuron, monuron y terbutiron. En la Figura 2.36., se observan las estructuras químicas del chlorotoluron y diuron.

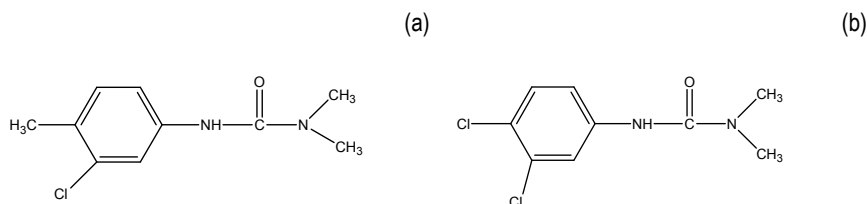


Figura 2.36. Estructura de (a) chlorotoluron y (b) diuron.

2.7. Riesgos de la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos

Por "*Residuo de plaguicida*" se entiende "*cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida*". El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como

productos de conversión, metabolitos y productos de reacción, y las impurezas consideradas de importancia toxicológica⁵.

Estos residuos están presentes en los alimentos debido a un uso legal de los productos fitosanitarios, y en la mayoría de los casos, los niveles no suponen ningún problema. El “uso legal” de los productos fitosanitarios implica que se apliquen las dosis recomendadas por el fabricante y en los periodos estacionales adecuados, respetando los periodos de reingreso y de carencia. El periodo de reingreso, *es el tiempo mínimo que se debe esperar, después de haberse hecho una aplicación para el ingreso de personas y/o animales al área tratada, y el periodo de carencia o de espera es el tiempo mínimo legalmente permitido, expresado usualmente en números de días, que debe transcurrir entre la última aplicación de un fitosanitario y el consumo del producto vegetal tratado.*

De cualquier modo, los residuos de plaguicidas pueden afectar negativamente a la salud, por lo que su presencia en los alimentos no es deseable, ya que se pueden acumular en el organismo y alcanzar concentraciones tóxicas. Generalmente los plaguicidas aparecen en los alimentos a muy bajas concentraciones, del orden de partes por millón (mg/Kg) o menos [111].

Se define Ingesta Diaria Admisible (IDA) como *“un índice toxicológico establecido por las autoridades competentes, tanto a nivel nacional como internacional, que expresa la cantidad de un compuesto químico (incluidos los plaguicidas), expresada en relación con el peso corporal, que puede ser ingerida a diario durante toda la vida de una persona sin que llegue a representar un riesgo apreciable para la salud”*. Es muy importante cuantificar bien los riesgos para la salud ocasionados por la exposición a contaminantes como los plaguicidas a través de la dieta. Las IDAs se obtienen en animales de laboratorio, después de administrarles el plaguicida en el alimento durante periodos prolongados de tiempo. De esta manera se determina el nivel de dosis sin efecto

⁵ El término "residuo de plaguicida" incluye tanto los residuos de procedencias desconocidas o inevitables (por ejemplo, ambientales), como los derivados de usos conocidos de la sustancia química.

(NOEL) y la IDA. *“La ingesta diaria admisible es la máxima cantidad del plaguicida que la especie experimental puede recibir sin ningún tipo de manifestación toxicológica”*. Pero esta es la parte que se lleva a cabo en animales de laboratorio. Luego hay de alguna manera que extrapolar estos datos al humano, lo que no es fácil. En general, lo que se hace es aplicar a la ingesta diaria admisible del animal de laboratorio un factor de seguridad que se ubica normalmente en un valor de 100, aunque a veces puede ser más bajo y, en oportunidades, ser elevado a 1000 (cuando los riesgos lo justifican). De esta manera se obtiene la IDA para el consumidor humano [112].

2.8. Medida de la toxicidad de un plaguicida

La toxicidad de los plaguicidas puede expresarse de un modo cuantitativo para animales de experimentación de distintas formas. Así, se denomina dosis letal media, representada como DL_{50} , al número de mg de ingredientes activo, por Kg de peso corporal, necesario para producir la muerte del 50% de una gran población de animales de prueba.

Según se realice la administración del producto puede distinguirse entre:

- DL_{50} oral aguda: se determina administrando una sola vez una dieta, como una determinada cantidad de tóxico en estudio, a varios grupos iguales de animales.
- DL_{50} oral crónica: se determina mediante la observación de los efectos producidos en los distintos grupos de animales de experimentación tras la administración en la dieta diaria de cantidades distintas del producto para cada uno de los lotes durante un tiempo determinado. Se expresa como mg/Kg de plaguicida presente en la dieta alimenticia, durante el tiempo que se especifique que producen efectos señalados.
- DL_{50} dérmica: valora las posibilidades de intoxicación por absorción del plaguicida a través de la piel y representa la cantidad de sustancia necesaria para producir la muerte del 50% de los animales de un lote de investigación, cuando se ha procedido a la fijación del tóxico sobre su piel mediante pincelación del mismo en estado puro o en disolución de la concentración que se indique.

Numerosos métodos de control pueden ser aplicados para establecer la presencia de sustancias tóxicas. Entre estos test se incluyen los bioensayos, en los que diferentes organismos se exponen a diferentes dosis de un contaminante para evaluar su toxicidad [113]. Esto se consigue monitorizando la integridad biológica de estos organismos y comparándola con un grupo de control que no ha sido expuesto al contaminante. Se realizan con cuatro grupos representativos: microorganismos, plantas, invertebrados y peces, que son muy diversos en composición y sensibilidad a determinados tóxicos. Entre los invertebrados el más aplicado es la "*Daphnia magna*", organismo que tiene la ventaja de ser muy sensible a los tóxicos y poseer un ciclo reproductivo corto. Se han establecido también test rápidos, fáciles y económicamente rentables como el que utilizan bacterias, como el Microtox, que usa la bioluminiscencia de una bacteria marina (*vibrio fischeri*) como medida de su actividad.

2.9. Normativa para plaguicidas en aceituna y aceite de oliva

Los productos fitosanitarios más aplicados en los olivares de los países mediterráneos son los herbicidas y los insecticidas. Algunos de los plaguicidas utilizados para controlar las plagas pueden persistir hasta la recolección y son lipofílicos, lo que favorece que sus residuos se concentren en el aceite durante el proceso de extracción, provocando la contaminación del mismo. El uso de plaguicidas puede determinar su presencia en las aceitunas y, consecuentemente, en el aceite de oliva, el cual debe de ser controlado regularmente [114].

El control de residuos tóxicos (orgánicos e inorgánicos) es uno de los principales puntos claves con vistas a la comercialización en el mercado de un aceite de oliva de calidad, para satisfacer las demandas y garantizar un consumo nutritivo y seguro. La producción agrícola requiere del tratamiento con plaguicidas en el olivar, con el fin de combatir plagas, enfermedades e incrementar los rendimientos de los cultivos. Sin embargo, el uso de estos productos fitosanitarios implica un riesgo, la contaminación del aceite de

oliva con residuos de estos plaguicidas, sus metabolitos, o productos de degradación, que pueden permanecer en el aceite de oliva. Por lo tanto, con el fin de proteger la salud de los consumidores, la UE, y la Comisión del Codex Alimentarius, FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como el COI, han establecido Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los plaguicidas en el aceite de oliva.

Según el Codex Alimentarius, se denomina Límite Máximo de Residuos (LMRs), *“a la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/Kg), para que se permita legalmente su uso en la superficie o la parte interna de productos alimenticios para consumo humano y de piensos”*. Los LMRs se basan en datos de “Buenas prácticas agrícolas en el uso de plaguicidas” (BPA), y tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos LMRs sean toxicológicamente aceptables.

Los LMRs del Codex, que se destinan principalmente para ser aplicados a productos que circulan en el comercio internacional, se obtienen basándose en estimaciones hechas por la JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*), después de:

- a. La evaluación toxicológica del plaguicida y su residuo
- b. El examen de datos de residuos obtenidos en ensayos y usos supervisados, en particular usos que se ajustan a las BPA nacionales. En el examen se incluyen datos de ensayos supervisados realizados a la concentración de uso más elevada recomendada, autorizada o registrada en el país. Para tener en cuenta las variaciones introducidas en los requisitos nacionales de control de plagas, en los LMRs del Codex se consideran los niveles más elevados observados en tales ensayos supervisados, que se estima representan las prácticas efectivas de control de plagas.

El examen de las diversas estimaciones y determinaciones, tanto a nivel nacional como internacional, de las ingestas de residuos a través de la alimentación, teniendo en

cuenta las IDA, debería indicar que los alimentos que se ajustan a los LMRs del Codex son inocuos para el consumo humano. La legislación sobre los LMRs deriva de cuatro Directivas fundamentales, 76/895/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE, todas ellas sustituidas por el Reglamento CE nº 396/2005, relativa a los LMRs de plaguicidas en productos de origen vegetal y animal. El reglamento reúne un solo texto y armoniza los límites aplicables a los diferentes productos destinados a la alimentación humana y animal, y fija un límite máximo de 0.01 mg/Kg aplicable por defecto.

Los valores establecidos por la UE en 1976 como LMRs de plaguicidas en las aceitunas y el aceite de oliva, se observan en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12. Límites máximos de residuos de plaguicidas en aceitunas y aceite de oliva virgen [115].

	<i>Plaguicida</i>	<i>Aceitunas (mg/Kg)</i>	<i>Aceite de oliva Virgen (mg/Kg)</i>
1	Carbaryl	30,0	25,0
2	Kresoxim – methyl	0,2	0,7
3	Methidathion	1,0	2,0
4	Deltamethrin	1,0	-
5	Difenoconazole	2,0	-
6	Dimethoate	0,5	-
7	Fentión	1,0	-
8	Paraquat	0,1	-
9	Permethrin	1,0	-

De igual manera, la FAO, ha estimado LMRs de plaguicidas en aceitunas, tal como se observa en la Tabla 2.13.

Tabla 2.13. Lista de LMRs para plaguicidas en aceitunas [116].

	<i>Plaguicida</i>	<i>FAO (mg/Kg)</i>	<i>CODEX (mg/Kg)</i>	<i>UE (mg/Kg)</i>
1	Buprofezin	3.5	---	0.01
2	Carbaryl	10	30	0.01
3	Carfentrazone-ethyl	0.1	---	0.01
4	Diuron	1	---	0.01
5	Fenpropathrin	5	---	0.01
6	Glyphosate	0.2	---	0.01
7	Methidathion	0.05	1	0.01

8	Oryzalin	0.05	---	0.01
9	Oxyfluorfen	0.05	---	0.01
10	Paraquat dichloride	0.05	0.1	0.02
11	Pendimethalin	0.1	---	0.01
12	Pyriproxyfen	1	---	0.01
13	Simazine	0.2	---	0.01

2.10. Plaguicidas empleados en el olivar

Los olivos son atacados por una gran variedad de plagas y enfermedades, que afectan tanto a la producción como a la calidad del aceite. La plaga más importante es la mosca del olivo, *Bactrocera oleae* (anteriormente denominada *Dacus oleae*), que afecta a la producción tanto en cantidad como en calidad, y que está considerada una de las plagas más importantes y temibles del olivo. La mosca adulta pone sus huevos en el fruto y la larva se desarrolla en el interior alimentándose del mesocarpio, lo que provoca la caída de las aceitunas y la disminución del peso (20%), y por tanto del rendimiento. Pero lo más importante es el daño indirecto que causa en la calidad del aceite de la aceituna atacada. El desarrollo de la larva origina en los frutos un gran número de galerías y agujeros, por donde penetran hongos (*Gloeosporium olivarium*) y bacterias que alteran gravemente la calidad de los aceites, aumentando la acidez y deteriorando las características organolépticas.

Otra plaga del olivar es la polilla del olivo (*Prays oleae*). De menor importancia son la cochinilla del olivo (*Saissetia oleae*), el barrenador de las ramas (*Euzophera pinguis*), el barrenillo del olivo (*Phloeotribus scarabaeoides*), la acariosis (*Aceria oleae*) y el arañuelo o piojo negro (*Liothrips oleae*) [117], siendo necesario por tanto un adecuado tratamiento agrícola para cada caso específico.

Por tanto, entre todos los diferentes tipos de plaguicidas, además de los herbicidas y los fungicidas, los insecticidas son los plaguicidas más utilizados. Entre los insecticidas más frecuentes se incluye el dimethoate, chlorpyrifos, methidathion y fenitrothion [118].

Los insecticidas más usados en el cultivo del olivar son los organofosforados [119], principalmente dimethoate, diazinon, parathion-methyl y chlorpyrifos se usa en combinación con endosulfan. Además, otros plaguicidas como fenthion y malathion han sido ampliamente utilizados en algunos de los países productores [120], como por ejemplo, Grecia.

La primera aplicación de plaguicidas se realiza en el comienzo de la primavera, principalmente fungicidas para el control de enfermedades. Posteriormente, durante la floración, en mayo, lo habitual es aplicar insecticidas a fin de controlar la polilla del olivo en su generación antófaga, al barrenador de las ramas, y posteriormente durante el mes de junio el barrenillo del olivo. A finales de verano, y comienzos del otoño, se suele proceder a la aplicación de tratamientos para controlar la población de la mosca del olivo, lo que se realiza mediante trampas cromáticas cebadas con feromonas o bien con trampas olfativas provistas de atrayentes alimenticios (fosfato de biamonio 40 g/Kg). Los plaguicidas se aplicarían si se observa una gran población de este díptero. Por último, en otoño tiene lugar una aplicación de fungicidas para el control de hongos foliares, y en ciertos casos se continua con tratamientos contra la mosca [108]. En la Tabla 2.14. se observan las principales plagas del olivo y los tratamientos recomendados.

Tabla 2.14. Principales plagas del olivo y tratamientos fitosanitarios recomendados.

Plaga	Tratamiento	Fecha de aplicación
Mosca del olivo (<i>Dacus oleae</i>)	Dimethoate, diazinon, deltamethrin, malathion, trichlorfon, formotion, methidathion, fosmet, fenthion	Julio
Polilla del olivo (<i>Prays oleae</i>)	Dimethoate, carbaryl, endosulfan, trichlorfon, chlorpyrifos, diazinon, formotion, fosmet, methidathion	Antes de la floración y eventualmente sobre las aceitunas en fase de crecimiento
Arañuela del olivo (<i>Liothrips oleae</i>)	Dimethoate, formotion, malathion, trichlorfon	Primavera y verano
Escarabajo picudo (<i>Coenrrhinus cribipennis</i>)	Esteres fosfóricos	Inmediatamente después del cuajado del fruto
Cochinilla del tizne (<i>Saissetia oleae</i>)	Carbaryl, fosmet, pirimiphos-methyl	Agosto

Abichado del olivo (<i>Euzophera pinguis</i>)	Fosmet, chlorpyrifos, Fenitrothion	Abril-mayo y octubre
Serpeta (<i>Lepidosaphes ulmi</i>)	Malathion	Verano
Polilla del Jazmín o Glifodes (<i>Margaronia unionalis</i>)	Carbaryl, dimethoate	Primavera

En encuestas recientes más del 80% de los consumidores consideran a los residuos de plaguicidas como un riesgo grave. Para garantizar la protección del consumidor, la concentración de plaguicidas de residuos en aceite de oliva debe ser controlada y las buenas prácticas agrícolas deben estar garantizadas. Los residuos de plaguicidas en el aceite de oliva dependen fundamentalmente del número de tratamientos, de la tasa de degradación del ingrediente activo, la solubilidad en grasas y del intervalo pre-cosecha [108].

2.11. Producción integrada

La producción integrada utiliza al máximo los recursos naturales, asegurando a largo plazo una agricultura sostenible, introduciendo en ella métodos biológicos y químicos de control, utilizando técnicas que compatibilicen las exigencias de la sociedad, la protección del medio ambiente y la productividad agrícola, así como las operaciones realizadas para la manipulación, envasado, transformación y etiquetado de productos vegetales.

En el ámbito nacional, la "Producción Integrada de productos agrícolas" está regulada por el Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre (BOE núm. 287 de sábado 30 noviembre 2002), que tiene por objeto:

- El establecimiento de las normas de producción y requisitos generales que deben cumplir los operadores que se acojan a los sistemas de producción integrada. En ellas se establecen, dentro de cada fase del ciclo productivo, las prácticas consideradas obligatorias y aquellas que se prohíben expresamente.
- La regulación del uso de la identificación de garantía que diferencie estos productos ante el consumidor.

- El reconocimiento de las Agrupaciones de Producción Integrada en Agricultura (APIs), para el fomento de dicha producción.
- La creación de la Comisión Nacional de Producción Integrada encargada del asesoramiento y coordinación en materia de producción integrada.

La producción integrada se articula en tres tipos de documentos, necesarios para su desarrollo, que se describen en los apartados siguientes:

a. *Reglamento genérico de producción integrada.* Donde se incluyen los requisitos generales que deben cumplir las asociaciones que quieran acogerse a esta marca de garantía, así como las reglas generales para las explotaciones integradas de las Asociaciones, aplicable al conjunto de los cultivos.

En este reglamento se contempla de forma general, las distintas prácticas agrícolas, estableciendo para cada una de ellas, las que son obligatorias, prohibidas o recomendadas. Se establecen los modelos de solicitud, mecanismos de tramitación y renovación. También fija los mecanismos de control y el régimen disciplinario.

Estos reglamentos incluyen la posibilidad de adosar en el envase del producto la marca de garantía, que certifica el cumplimiento del Reglamento de Producción Integrada correspondiente al producto que lo exhibe.

b. *Reglamento específico de producción integrada para cada cultivo.* En este Reglamento se desarrolla para cada cultivo, y en su caso los procesos industriales, la comercialización, así como las normas de Producción Integrada.

La estructura de los Reglamentos específicos es similar para todos los productos:

- Define los requisitos técnicos que deben cumplir las APIs respecto al número máximo de agricultores y superficie que un técnico puede supervisar. Varía en función de la intensidad del sistema de cultivo: desde 40 Ha para la fresa hasta las 2.500 Ha en el caso del olivo.
- Establece una serie de normas con carácter obligatorio, prohibido o recomendado, para cada una de las prácticas culturales: laboreo, fertilización, riego, recolección, poda, etc.

- Define una estrategia de Control Integrado para cada cultivo, siendo obligatorio definir para cada especie nociva:

- Método de muestreo que permita evaluar el riesgo.
- Los umbrales de intervención mediante técnicas de control.
- El método de control, que ha de incluir una lista específica de materias activas autorizadas.

c. *Normas técnicas de producción integrada.* Son normas de índole técnico en las que se desarrollan algunos aspectos de los reglamentos, tales como procedimiento de cálculo de las necesidades de riego, calibración de maquinaria, etc.

2.11.1. Reglamento específico de producción integrada del olivar

El actual reglamento para la producción integrada del olivar, es el publicado el 18 de julio del 2002, como todos los reglamentos de producción integrada tiene una estructura muy similar. Para cada técnica de cultivo se definen aquellas prácticas agronómicas que son obligatorias, que necesariamente se deben llevar a cabo, y las prohibidas, aquellas que por no adecuarse a los objetivos de la producción integrada no se pueden realizar, y las recomendadas, que no son de obligado cumplimiento, pero que por ser buenas prácticas agrícolas se recomienda su realización.

2.11.2. Reglamento específico de producción integrada para industrias de elaboración de aceite de oliva

Este Reglamento ha sido publicado el 5 de noviembre de 2003, siendo éste el primer año que las almazaras pudieron elaborar aceite de producción integrada. Hasta éste año 2003, no podía comercializarse aceite de oliva con la Marca de Garantía, al no poder usarse la marca en productos elaborados o transformados. La almazara tendrá que conservar la trazabilidad de todo el proceso productivo, desde la recepción hasta la comercialización del aceite, asegurando que en ningún momento se mezclará aceituna calificada de producción integrada con la convencional.

2.12. Aceite de oliva ecológico

Una de las vías para acreditar la calidad de un aceite es el de la agricultura biológica o ecológica. Los objetivos de la producción agraria ecológica son obtener alimentos de alta calidad nutritiva, sin residuos ni otras sustancias ajenas. A la vez que se respeta el medio ambiente con las técnicas de cultivo y producción empleadas.

La producción agraria ecológica está regulada por el Reglamento CEE 2092/91. En España, las funciones de control las ejerce el Consejo Regulador de Agricultura Ecológica (CRAE). En 1988, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Español ya intentó incluir los productos ecológicos dentro de los considerados por las Denominaciones Genéricas de Calidad y en 1989 se creó el CRAE. Al publicarse el reglamento comunitario que regula la producción agraria y agroalimentaria ecológica, el CRAE asumió las funciones de control.

Actualmente, desde el 1 de enero de 2009, fecha en que se inició la aplicación de la producción ecológica, ésta se encuentra regulada por el Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, que deroga el Reglamento (CEE) 2092/91, y por los Reglamentos: R(CE) 889/2008 de la Comisión, por el que se establecen disposiciones de aplicación del R(CE) 834/2007 con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y control y R(CE) 1235/2008 de la Comisión por el que se establecen las disposiciones de aplicación del R(CE) 834/2007, en lo que se refiere a las importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países.

En España, el control y la certificación de la producción agraria ecológica es competencia de las Comunidades Autónomas y se lleva a cabo mayoritariamente por autoridades de control públicas, a través de Consejos o Comités de Agricultura Ecológica territoriales que son organismos dependientes de las correspondientes Consejerías o Departamentos de Agricultura, o directamente por Direcciones Generales adscritas a las mismas.

No obstante, las Comunidades Autónomas de Andalucía y Castilla La Mancha, han autorizado organismos privados para la realización de estas funciones y, en el caso de Aragón, las autoridades competentes han designado una autoridad de control pública y han autorizado a su vez a organismos de control privados.

Como distintivo para que el consumidor pueda distinguir en el mercado los productos de la agricultura ecológica, todas las unidades envasadas, además de su propia marca y alguna de las menciones específicas de la agricultura ecológica, llevan impreso el código de la autoridad y organismo de control o un logo específico, con el nombre y el código de la entidad de control. También puede ir impreso el logo comunitario de la UE, que es obligatorio, en un nuevo diseño, a partir del 1 de julio de 2010, en las condiciones establecidas en la normativa.

Todo ello significa que la finca o industria donde se ha producido o elaborado el producto, está sometida a los controles e inspecciones correspondientes de la Autoridad o del Organismo competente al efecto, en la respectiva Comunidad Autónoma. Constituye, a su vez, la única garantía oficial de que el producto responde a la calidad supuesta por el consumidor y cumple las normas establecidas en el Reglamento (CE) 834/2007 y sus disposiciones de aplicación.

2.13. Métodos de análisis para la determinación de plaguicidas y otros contaminantes

Los métodos de análisis de residuos de plaguicidas constan de dos etapas, la preparación de muestras (extracción de plaguicidas) y la determinación analítica de plaguicidas, por lo general se utilizan métodos cromatográficos.

La preparación de muestras para su análisis, consiste en una serie de pasos encaminados a la obtención de un extracto que contenga los compuestos de interés

(analitos) en un disolvente adecuado para la técnica de análisis a emplear. A continuación, se explicarán algunos de los métodos usados para la determinación de plaguicidas y contaminantes.

2.13.1. Métodos de extracción de plaguicidas y contaminantes

La extracción de los plaguicidas es la primera etapa de la preparación de la muestra, se debe conseguir una muestra homogénea y representativa. El objetivo de esta etapa del método analítico es aislar el analito de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar la naturaleza no sólo del analito sino también de la matriz, para que esta etapa sea lo más eficiente posible.

A continuación, se describen las técnicas empleadas para extraer plaguicidas en muestras acuosas y aceite de oliva.

2.13.1.1. Extracción líquido - líquido

La extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE), es la técnica más ampliamente utilizada para la extracción de analitos de muestras acuosas. Se basa en una distribución o reparto de los analitos de la muestra entre dos disolventes inmiscibles donde el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes. La eficiencia del proceso depende de varios factores como son la afinidad del analito por el disolvente y el número de extracciones sucesivas que se lleven a cabo. El uso de mezclas de disolventes, la adición de sales o el cambio del pH pueden mejorar el rendimiento de la extracción.

La principal característica que debe poseer un disolvente orgánico para su empleo en un proceso de extracción líquido-líquido es su baja solubilidad y reactividad con el agua. Otras propiedades tales como: que su punto de ebullición no sea excesivamente bajo; que posean una presión de vapor y viscosidad moderada; que su densidad sea adecuada para originar una separación de fases; que tengan una baja tendencia a

formar emulsiones, que posea una estabilidad química aceptable, y que no posea carácter tóxico son adicionalmente aconsejables.

La extracción está regida por la ley de distribución, propuesta por Berthelot y Jungfleisch y desarrollada por Nersnt, la cual establece que en el equilibrio, la relación de solutos entre dos fases inmiscibles es constante, siempre que dicho soluto se encuentre en la misma forma en ambas fases [121].

Las principales limitaciones de la extracción líquido-líquido son las siguientes:

1. La formación de emulsiones, especialmente en muestras que contienen surfactantes o grasas.
2. La recuperación de un mismo analito varía en función de la naturaleza de la matriz.
3. El riesgo de contaminación es elevado, por lo que es necesario el uso de disolventes de alta pureza.
4. La pérdida del analito debido a su adsorción en los recipientes usados.
5. La interfase de separación aumenta con la agitación del sistema que contiene las dos fases.
6. La duración de la misma puede variar entre amplios límites con el inconveniente de que alguna sustancia se altere si se prolonga excesivamente la agitación.

2.13.1.2. Extracción en fase sólida

Los plaguicidas son en general, compuestos de baja polaridad que frecuentemente tienen que ser extraídos de una matriz acuosa o con un alto contenido en agua. En la extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE), como se observa en la Figura 2.38., la muestra se pasa por un cartucho o una columna empaquetada con un adsorbente en el cual quedan retenidos los plaguicidas. Una elución subsiguiente con un disolvente orgánico permite obtener los plaguicidas en un extracto orgánico concentrado, que normalmente es bastante limpio y puede ser analizado por cromatografía de gases o cromatografía líquida. Los adsorbentes más usados son las

alquilsílicas (C_8 y C_{18}) y, recientemente, una fase polimérica (Oasis HLB), formada por un copolímero de vinil benceno y de vinil pirrolidona, que ha sido utilizada con buenos resultados [122]. Además, también se han empleado tierra de diatomeas o columnas de intercambio catiónico para los compuestos iónicos.

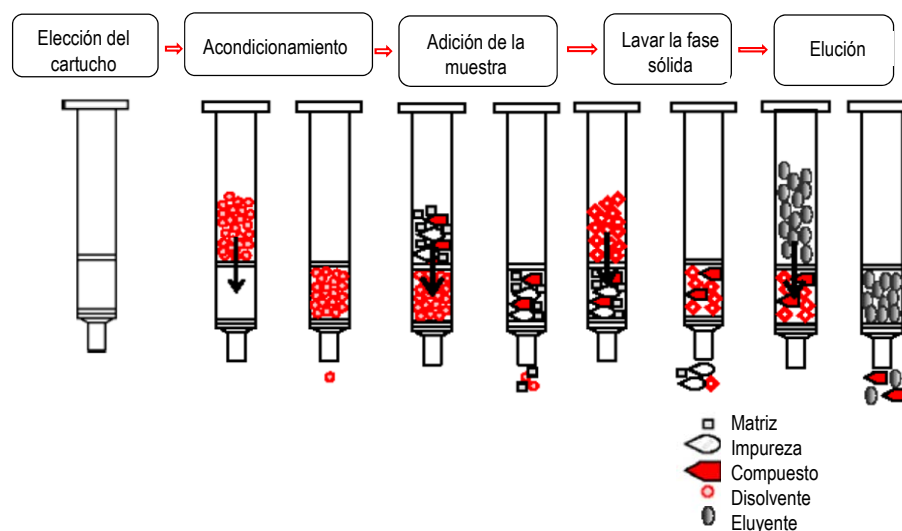


Figura 2.38. Pasos para la extracción en fase sólida.

Normalmente, la SPE consta de cuatro etapas: acondicionamiento, adición de la muestra, lavado y elución. En el acondicionamiento se solvata la fase sólida para que se facilite la carga de la muestra y en el lavado se eliminan las interferencias.

En la elución se emplea un disolvente con fuerza eluyente que permita obtener el analito en un volumen de extracción pequeño para su posterior análisis cromatográfico. A veces el extracto se evapora para concentrar el analito o para redisolverlo en un disolvente compatible con la técnica cromatográfica seleccionada.

En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos basados en SPE para determinar plaguicidas en distintos tipos de alimentos, que han sido evaluados en diversos trabajos de revisión bibliográfica. Entre éstos, cabe citar la revisión de los

diferentes métodos publicados para plaguicidas en alimentos [123], en aceites vegetales [124] y en varios tipos de alimentos [125].

2.13.1.3. Método QuEChERS

En 2003, Anastassaides y colaboradores desarrollaron un método nuevo para determinar residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas al que denominaron QuEChERS que son las siglas de *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, es decir, rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. Este nuevo método de preparar las muestras surgió de la necesidad de desarrollar métodos multiresiduos rápidos y económicos pero que proporcionaran resultados de gran calidad y fiabilidad.

Este método se observa en la Figura 2.39., que consiste en una extracción de una pequeña cantidad de muestra representativa y homogénea (10–15 g) con un disolvente miscible con el agua, como el acetonitrilo o la acetona, seguida de la adición de sales como el cloruro sódico o el sulfato magnésico. La adición de éstas induce la separación de las dos fases y que el analito migre de la fase acuosa a la fase orgánica consiguiéndose recuperaciones muy altas incluso con plaguicidas polares y solubles en agua. Además de estas sales, se suele añadir agentes que regulen el pH como el citrato para estabilizar plaguicidas de carácter básico y patrones internos como el trifenilfosfato, y así minimizar todos los posibles errores que se pueden generar durante el método QuEChERS. Después de agitar la muestra, ésta se centrifuga y una alícuota de la fase orgánica se somete a un proceso de purificación empleando la extracción en fase sólida dispersiva. En este caso, se añade una pequeña cantidad de adsorbente SPE, generalmente de PSA (amina primaria y secundaria) al extracto, se agita y se centrifuga, en lugar de pasar el extracto por un cartucho relleno con el adsorbente previamente acondicionado. La PSA es un adsorbente de intercambio aniónico débil que elimina ácidos grasos, azúcares y otros componentes de la matriz que pueden formar puentes de hidrógeno [125]. El sobrenadante se puede analizar directamente o se puede

concentrar para reconstituirlo en un disolvente adecuado para su análisis. Como cualquier otra técnica de preparación de muestras, se debe llevar a cabo la optimización del método ya que existen parámetros como el tipo de muestra, la naturaleza del disolvente y de las sales y el pH que influyen en la eficiencia de la extracción.

Esta técnica ha permitido determinar un elevado número de plaguicidas pertenecientes a diferentes familias químicas en alimentos de origen vegetal tales como el aceite de oliva [126] y hortalizas [127].

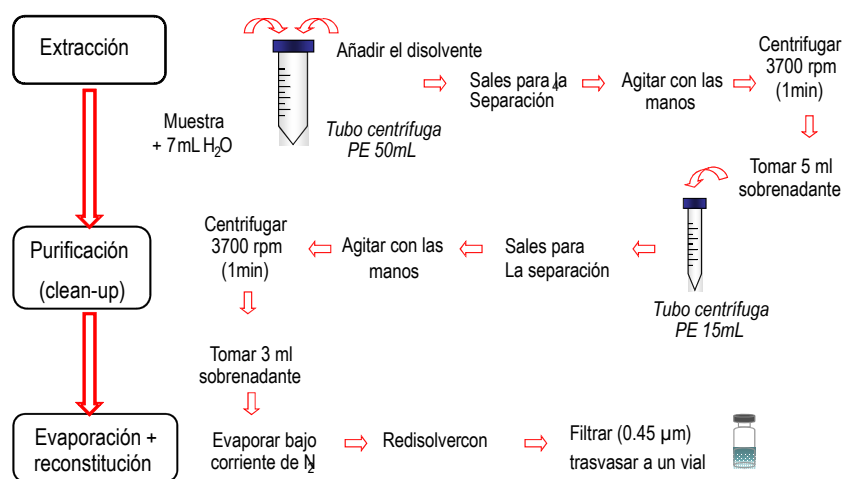


Figura 2.39. Método QuEChERS.

2.13.1.4. Microextracción en fase sólida

La Microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME), desarrollada en 1990 por Pawliszyn y colaboradores [128], es una técnica de extracción que utiliza una fase estacionaria apropiada para cada tipo de compuesto con los que se trabaje. Se introduce como una técnica que no necesita disolventes en la preparación de la muestra y sobre todo destaca la pequeña cantidad de muestra que necesita, se utiliza tanto para

compuestos orgánicos volátiles, como no volátiles. Presenta además, otras ventajas inherentes, como que apenas requiere tratamiento de muestra, permite la automatización y puede aplicarse al análisis tanto de muestras líquidas y gaseosas, como de muestras sólidas, de forma indirecta.

En esta técnica, una pequeña proporción de fase de extracción dispersa en un soporte sólido se expone a la muestra por un periodo de tiempo definido, pasado el cual se produce un equilibrio entre las distintas fases. El número de fases que intervienen en el equilibrio son dos o tres: matriz o muestra, fibra y fase gas, en función del modo de trabajo. Se han considerado numerosos soportes de fase estacionaria para SPME como son: fibras, tubos, discos, partículas en suspensión, etc. Las más utilizadas son las fibras y los tubos para SPME. Pueden acoplarse a varios tipos de técnicas analíticas: CG [129], LC [130] y también se aplica a una gran variedad de compuestos polares y no polares, en muestras gaseosas, líquidas y sólidas [131].

El dispositivo de SPME más utilizado es el fabricado por Supelco, que consiste en una fibra de sílice fundida recubierta por distintos polímeros y fijada a una aguja de acero inoxidable. La fibra se introduce en un soporte que puede describirse como una jeringa modificada. Consta de un émbolo, para permitir la exposición y protección de la fibra, un cuerpo metálico y un cuerpo ajustable, para la reproducibilidad en la colocación de la fibra.

El procedimiento de la SPME consta de dos etapas: extracción y posterior desorción. EL esquema general de estas dos etapas, se muestra en la Figura 2.40.

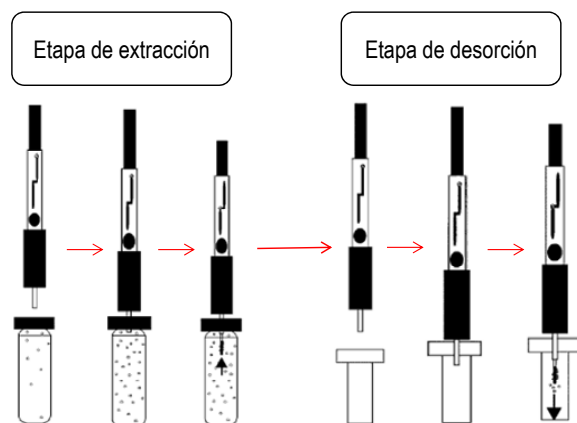


Figura 2.40. Etapas de SPME: extracción y desorción.

En principio la fibra está dentro de su protección de acero. Para realizar, se introduce esta protección a través del septum (previamente agujereado) del vial donde se encuentra la muestra, seguidamente, se presiona el émbolo para exponer la fibra a la muestra y que se produzca la extracción de los analitos. Después de un tiempo determinado (tiempo de extracción) se hace ascender la fibra de nuevo a su protección y se extrae del vial. Inmediatamente se coloca el dispositivo en el instrumento de análisis, donde los analitos son liberados, bien por desorción térmica, por orgánicos, por contacto con la fase móvil de HPLC, para ello es necesario una interfase SPME/LC y una válvula de inyección modificada.

El muestreo SPME puede realizarse siguiendo tres tipos básicos de extracción, representados en la Figura 2.41. [128, 131].

- Extracción directa o por inmersión, el recubrimiento de la fibra se pone en contacto con la muestra y los analitos se transfieren directamente desde la matriz de la muestra al polímero extractante. Se utiliza para analitos poco volátiles.
- Extracción en espacio de cabeza (HS-SPME), los analitos son extraídos de la fase gas en equilibrio con la muestra líquida. Para ello, las muestras deben estar contenidas en viales herméticamente cerrados. Se aplica para analitos de volatilidad

alta presentes en matrices complejas, para compuestos semivolátiles es necesario acelerar el paso de la matriz al espacio de cabeza, utilizando agitación y aumentando la temperatura de extracción.

- c. Extracción con membrana de protección, la fibra se expone a la muestra recubierta por una membrana selectiva que le permite el paso de los analitos e impide paso de interferencias.

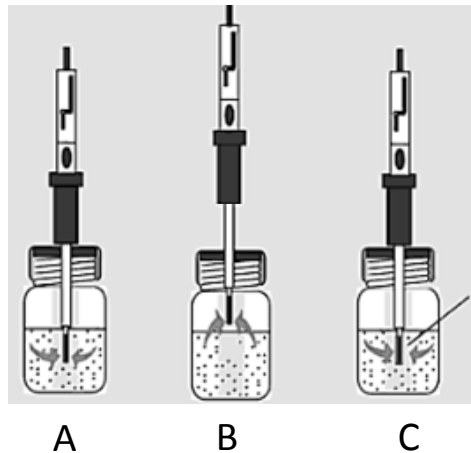


Figura 2.41. Modos de extracción: A) Extracción directa; B) Extracción en espacio de cabeza; C) Extracción de protección.

2.13.1.5. Cromatografía de permeación en gel

La cromatografía de permeación en gel (*Gel permeation chromatography, GPC*) [132], es también conocida con el nombre de cromatografía de exclusión por tamaño (*Size exclusion chromatography, SEC*). Esta técnica permite la separación de las moléculas según su tamaño, utilizando fases estacionarias de una porosidad determinada: los poros deben tener un diámetro del mismo orden de tamaño que el de las especies a separar, que irán disueltas en la fase móvil. Las moléculas cuyo diámetro es más grande que el de los poros, son “excluidas” de la fase estacionaria, ya que atraviesan la

columna sin ser retenidas formando un único pico en el cromatograma. La ausencia de interacción química con la fase estacionaria, una elución rápida y la recuperación total de los analitos constituyen los puntos fuertes de esta técnica. No se utiliza gradiente de elución, dado que no hay interacción soluto-fase móvil. En GPC se utilizan geles de estireno - divinilbenceno para separar moléculas o polímeros de síntesis. La instrumentación es comparable a la utilizada en HPLC.

La GPC se utiliza a menudo como técnica de clean - up o purificación de extractos, sobre todo para eliminar interferentes de tipo lipídico de muestras con alto contenido graso (aceites, aceitunas, etc) a las que se le va a hacer un análisis multi - residuo. Para ello, se suele utilizar como fase estacionaria un copolímero de estireno - divinilbenceno. Como fase móvil se emplea una mezcla de acetato de etilo/ciclohexano [133], que recientemente ha reemplazado el uso de diclorometano [134], más tóxico.

2.13.2. Determinación analítica de plaguicidas y contaminantes

Para la determinación de plaguicidas y la identificación de sus principales productos de degradación, se debe disponer de métodos analíticos que permitan la separación e identificación de un gran número de compuestos. Esto es posible mediante el empleo de herramientas analíticas, equipos y técnicas muy sofisticadas, basadas en el acoplamiento cromatografía/espectrometría de masas, que permiten la determinación eficaz de compuestos orgánicos, como es el caso de plaguicidas.

El acoplamiento cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS) proporciona suficiente selectividad y sensibilidad para el análisis de compuestos relativamente apolares, volátiles y térmicamente estables [135]. Sin embargo, la presencia de grupos funcionales polares en la estructura de los nuevos contaminantes hace obligatoria la introducción de una etapa de derivatización. Es por ello, que cada vez se utiliza más el acoplamiento cromatografía de líquidos - espectrometría de masas (LC-MS).

Durante los procesos fotoquímicos de degradación de plaguicidas pueden originarse un gran número de productos de degradación [30, 136]. Estos productos de degradación (PDs), pueden ser aún más resistentes a la degradación [137].

La identificación de los productos de degradación requiere el uso de técnicas analíticas que sean capaces de [138]:

1. Proporcionar una alta sensibilidad en un modo de barrido completo de iones o *full scan*.
2. Proporcionar información estructural altamente específica y abundante.
3. No presentar restricciones en cuanto al tipo y la cantidad de compuestos que se puedan analizar de forma simultánea.

En esta tesis se han estudiado los PDs empleando LC-TOFMS como técnica para la elucidación de los productos de degradación generados durante los diferentes ensayos con radiación UV.

2.13.2.1. Cromatografía de líquidos

La HPLC, es probablemente la técnica analítica de separación más utilizada actualmente, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles. El tipo de cromatografía líquida más utilizada es la de reparto, en el que el analito se distribuye entre la fase móvil líquida (generalmente un disolvente o mezclas de disolventes polares) y una fase líquida (fase estacionaria generalmente apolar) inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte según su polaridad. Generalmente se utiliza una elución en gradiente, de modo que se utiliza una mezcla de dos o tres disolventes de polaridad distinta cuya proporción varía de forma programada durante el análisis.

El análisis de plaguicidas en los alimentos y en el agua son algunas de las principales preocupaciones ambientales, y con las nuevas técnicas instrumentales constantemente se busca una mejor detección y vigilancia. En este campo, el acoplamiento de

cromatografía líquida con espectrometría de masas, empleando analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) se puede considerar como una técnica relativamente reciente de gran valor para el control de los plaguicidas, gracias a la capacidad que presenta para llevar a cabo medidas de masas exactas de los iones en estudio, que van a permitir la identificación inequívoca de las especies de interés, como ha sido descrito recientemente en la literatura para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y agua [139, 140]. Además, las medidas de masa/carga exacta de iones en LC-TOFMS permiten la identificación inequívoca de productos de degradación [141]. Existen algunas aplicaciones en las que se proponen protocolos para el descubrimiento, identificación y confirmación de productos de degradación mediante LC-TOFMS [142, 143].

La mayoría de los fabricantes de instrumentos de HPLC, ofrecen detectores de absorción ultravioleta (UV), o ultravioleta-visible (UV-Vis) de diodos en serie. Estos instrumentos permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo, de forma que los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden recoger y almacenar a medida que van saliendo de la columna.

Otro tipo de detectores ópticos muy usados en cromatografía líquida son los detectores de fluorescencia, más sensibles que los de absorción UV-Vis. Sin embargo, son menos universales y a veces es necesario realizar un tratamiento de la muestra para originar derivados fluorescentes de los analitos de interés. Este tratamiento de derivatización puede realizarse como paso previo a la separación cromatográfica, o posterior a la misma mediante un procedimiento on-line (tratamiento post-columna).

También se han usado detectores de índice de refracción, que tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Sin embargo, su respuesta se ve muy afectada por los cambios de temperatura, y además no son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores.

2.13.2.2. Cromatografía de gases

En cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte (generalmente helio o nitrógeno) que no interacciona con las moléculas de analito: su única función es la de transportar el analito a través de la columna. El analito se distribuye entre la fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

Existen distintas formas de introducir la muestra en un cromatógrafo de gases:

- a) Inyección de muestras líquidas. Es necesario preparar un extracto de la muestra en un disolvente volátil, siendo los más utilizados acetona, n-hexano y ciclohexano. El volumen de extracto inyectado está comprendido entre 1-20 μL .
- b) Espacio de cabeza estático (HS). Se inyecta un volumen del espacio de cabeza del vial, por lo que esta modalidad es muy limpia, ya que evita la acumulación de componentes no volátiles en el cromatógrafo de gases. A bajas concentraciones (< 50 ppb), el equilibrio de distribución de los analitos entre la muestra y el espacio de cabeza depende de la concentración, no del volumen de la muestra. Sin embargo, a concentraciones mayores, el volumen adquiere una mayor significación y se debe mantener constante en todas las muestras y patrones.
- c) Espacio de cabeza dinámico (purga y trampa).- Los componentes volátiles de la muestra son arrastrados mediante una corriente gaseosa hasta una trampa fría o un soporte inerte, donde se produce el enriquecimiento de los analitos, que después son transferidos directamente hacia el cromatógrafo de gases mediante desorción térmica. La principal desventaja de esta técnica es que los interferentes volátiles son preconcentrados al mismo tiempo que los analitos.
- d) SPME.- Como se ha comentado previamente (apartado 2.13.1.4.), los analitos pueden ser desorbidos de la fibra directamente en el inyector del cromatógrafo de gases.

Actualmente existen en el mercado unos muestreadores automáticos para GC muy versátiles, que permiten el análisis de muestras por cualquiera de los modos de inyección descritos. Para pasar de un modo de inyección a otro es necesario un pequeño ajuste de la configuración del muestreador.

2.13.2.3. Espectrometría de masas como detector

2.13.2.4.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica basada en la ionización de la muestra y en la separación y registro de los iones producidos, según su relación masa-carga, en un sistema de vacío. Actualmente, es la técnica de detección más empleada para el análisis de contaminantes en alimentos, reemplazando progresivamente a los detectores selectivos en cromatografía gaseosa y los detectores ópticos en cromatografía líquida. Esto es debido a las exigencias cada vez mayores de sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos, marcadas por los bajos MRLs tolerados para mantener un gran nivel de seguridad alimentaria [144, 145].

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación masa-carga, m/z (donde m es la masa del ion en unidades de masa atómica y z es su carga). La mayoría de los iones que se estudian presentan una sola carga, de modo que la relación es sencillamente el peso molecular del ion. Un hecho característico de los espectrómetros de masas es la necesidad de disponer de un sistema de vacío adecuado para mantener bajas presiones (de 10^{-8} a 10^{-4} torr) en todos los componentes del instrumento (ver Figura 2.42). La necesidad de producir un alto vacío se debe a que las partículas cargadas (incluidos los electrones) interaccionan mediante colisiones con los componentes de la atmósfera y como consecuencia son destruidas. Un espectrómetro de masas consta de tres partes fundamentales: la fuente de iones, el analizador de iones (o de masas) y el detector.

Podemos esquematizar un espectrómetro de masas de la siguiente forma, tal como se observa en la Figura 2.42. El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas:

1. Introducción de la muestra.
2. Ionización de la muestra, en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa.
3. Separación y análisis de los iones moleculares y fragmentos cargados producidos, según su valor de relación masa/carga (m/z).
4. Finalmente, se obtiene el espectro de masas, en el que se representa la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación masa/carga (m/z).

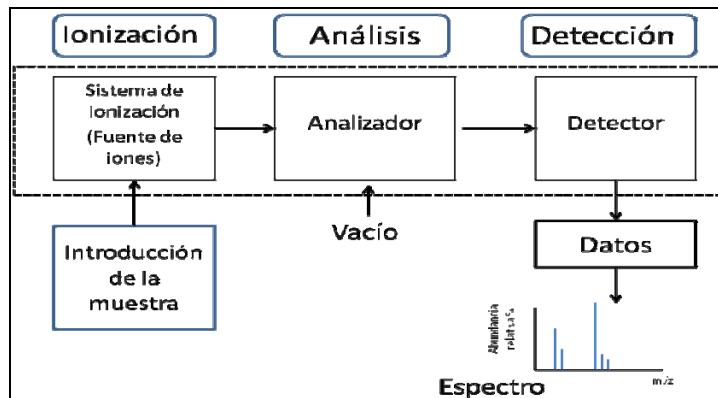


Figura 2.42. Esquema de un espectrómetro de masas.

Existen tres tipos de fuentes de ionización: el impacto electrónico (*electron impact* - EI), la ionización química positiva y la ionización química negativa, siendo la primera la más utilizada ya que se genera un gran número de fragmentos característicos y existen bases de datos, que se pueden consultar, con los espectros de masas de multitud de compuestos. La Figura 2.43. nos muestra que, tanto el método de ionización, como el analizador, pueden ser de varios tipos.

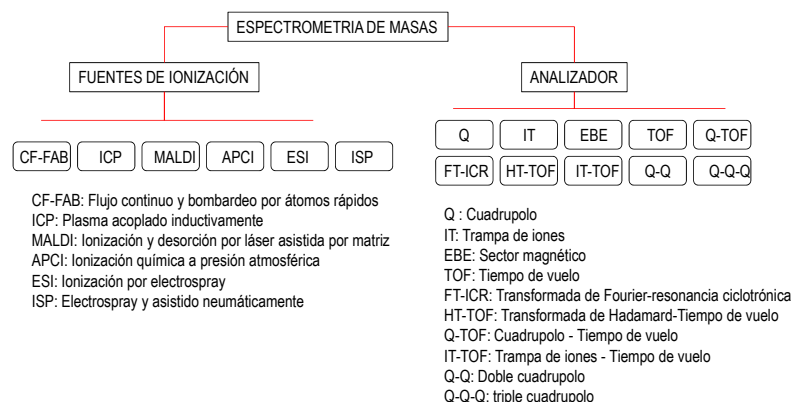


Figura 2.43. Espectrometría de masas: fuentes de ionización y analizadores comerciales.

En el análisis por GC-MS, la fuente de iones se encarga de transformar la corriente gaseosa que abandona el cromatógrafo de gases en una corriente de iones. Para ello, se utilizan fuentes de ionización en fase gaseosa, puesto que primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza. A continuación, se resumen las principales características de las fuentes de ionización más utilizadas en GC-MS:

- *Impacto electrónico (EI).*

La muestra llega a la fuente en forma gaseosa (o se vaporiza in situ, si se hace un análisis directo por espectrometría de masas) y allí las moléculas son ionizadas por bombardeo con un haz de electrones de elevada energía [146]. Los electrones son emitidos por un filamento caliente de wolframio o de renio y se aceleran mediante un potencial de 70 eV que se aplica entre el filamento y el ánodo. Las trayectorias de los electrones y las moléculas están en ángulo recto y se cruzan en el centro de la fuente, donde colisionan y tiene lugar la ionización. El producto primario son iones de una única carga positiva que se forman cuando los electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones por repulsión electrostática (ion molecular, M^+). Sin embargo, la pequeña masa y la elevada energía cinética de los electrones generados en la fuente provoca pequeños aumentos

en la energía cinética de las moléculas con las que chocan, de forma que éstas adquieren estados vibracionales y rotacionales excitados.

La subsecuente relajación tiene lugar normalmente mediante una elevada fragmentación que da lugar a un gran número de iones positivos de diversas masas que son menores (y en ocasiones mayores) que las del ion molecular. Los complejos espectros de masas que se obtienen en la ionización por impacto de electrones son útiles para la identificación de compuestos. Existen bases de datos comerciales que contienen los espectros, obtenidos por impacto electrónico (siempre a 70 eV), de compuestos orgánicos de interés. No obstante, para cierto tipo de moléculas la fragmentación es tan efectiva que no queda ningún ion molecular, perdiéndose por tanto la información más importante para la determinación de la masa molecular (si la molécula es desconocida). Este tipo de fuente es sólo aplicable a analitos con masas moleculares menores de unos 103 daltons y que sean térmicamente estables, ya que es necesaria la volatilización de la muestra previa a su ionización.

- Ionización química (CI).

El diseño de este tipo de fuente es muy similar a las de impacto electrónico, pero en este caso los electrones generados no colisionan directamente con la muestra, sino con un gas reactivo. Las moléculas gaseosas de la muestra se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear con electrones un exceso de gas reactivo [146]. Para llevar a cabo experimentos mediante ionización química, se introduce un reactivo gaseoso en la región de ionización y se mantiene a una presión de aproximadamente 1 torr, en una cantidad tal que la relación de concentración entre el reactivo y la muestra sea de $10^3 - 10^4$. Debido a esta gran diferencia de concentración, el haz de electrones reacciona casi exclusivamente con las moléculas de reactivo. Los iones reactivos dan lugar a reacciones de transferencia de protones o de hidruros con las moléculas de analito, originando, respectivamente, iones moleculares protonados ($[M+H]^+$) o desprotonados ($[M-H]^-$). Normalmente se utilizan iones positivos, aunque la ionización química que origina iones negativos se utiliza ocasionalmente en aquellos analitos que

contienen átomos muy electronegativos. Uno de los reactivos más comunes es el metano, aunque también se han utilizado gases como propano, isobutano y amoníaco. Cada uno de ellos produce un espectro diferente con el mismo analito, siendo en cualquier caso los espectros de ionización química más sencillos (con menor fragmentación) que los espectros de impacto de electrones.

Un problema fundamental del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas es el enorme contraste que existe entre los volúmenes de disolventes relativamente grandes de la primera y los requerimientos de vacío de la última. El efluente de la columna, que será un líquido compuesto por la muestra y los disolventes, tendrá que ser transformado en una corriente gaseosa de iones. Una primera aproximación consistió en el desarrollo de interfases que realizaban esta transformación en dos pasos: primero se eliminaba el disolvente y posteriormente se ionizaba el analito en forma gaseosa. Estas interfases (p.ej.: *particle beam (PB)*, *moving belt/wire* [147]) presentaban bastantes inconvenientes, sobre todo cuando se aumentaba el contenido de agua de la fase móvil.

Actualmente se utilizan las llamadas “fuentes de desorción”, de forma que la muestra en estado líquido se transforma directamente en iones gaseosos. Una ventaja de este tipo de fuentes es que son aplicables a analitos no volátiles y térmicamente inestables. Las fuentes de desorción suelen ser fuentes blandas, de forma que el espectro de masas resultante estará formado básicamente por el ion molecular protonado si trabajamos en modo positivo ($[M+H]^+$), y por el ion molecular desprotonado si trabajamos en modo negativo ($[M-H]^-$).

- Presión atmosférica (*API – atmospheric pressure ionization*), esta fuente de ionización es una de las más utilizadas actualmente. La instrumentación para todas ellas es común, excepto la sonda por donde se introduce la muestra. Se diferencian en el proceso de ionización y en las aplicaciones analíticas. Todas ellas son fuentes de ionización blandas, sensibles y robustas. Las ventajas de las fuentes API fueron resumidas por Voyksner [148] en cuatro puntos:

- Permiten trabajar con volúmenes de líquidos típicamente utilizados en LC.
- Son apropiadas para el análisis de compuestos no volátiles, polares y térmicamente inestables típicamente analizados por LC.

A continuación, se exponen los fundamentos de las principales fuentes API: electrospray, ionización química a presión atmosférica y fotoionización a presión atmosférica.

- *Electrospray (ESI).*

Es la fuente de ionización más usada en LC-MS. Fue introducida en el campo de la espectrometría de masas a finales de los años 70 [149], principio de los 80 [150]. Se basa en la aplicación de un fuerte campo eléctrico a presión atmosférica a un líquido que fluye a través de un capilar metálico (aguja de nebulización) con un caudal bajo ($1 - 1000 \mu\text{L min}^{-1}$). Este campo eléctrico se genera aplicando una diferencia de potencial entre la aguja y un electrodo cilíndrico que la rodea y está separado de ella una distancia de 0.3 - 2 cm. El campo eléctrico induce una acumulación de carga en la superficie del líquido localizado al final de la aguja, de forma que éste se divide en pequeñas gotas cargadas. Un gas inyectado de forma coaxial y con un bajo caudal permite que la dispersión del spray sea limitada en el espacio. Estas gotas pasan después a través de una cortina de gas inerte (generalmente N_2) a alta temperatura para eliminar gran parte de las moléculas de disolvente, de forma que disminuye el tamaño de las gotas y aumenta la densidad de carga. Cuando la fuerza del campo en la superficie de la gota supera la energía de solvatación de los iones del analito, se produce la transferencia de dichos iones a la fase gaseosa. Finalmente, el proceso se completará en el interior de un capilar que guiará a los iones del analito hacia el analizador (Figura 2.44).

La formación de iones, por tanto, es el resultado de un proceso electroquímico y de la acumulación de carga en las gotas. La corriente de electrospray está limitada por el proceso electroquímico que ocurre en la punta de la aguja del nebulizador y es sensible a la concentración, en vez de a la cantidad total de muestra. Esto permite la miniaturización de la técnica sin pérdida de sensibilidad, pero con una reducción de

varios órdenes de magnitud en cuanto a consumo de muestra. Esto se aplica en nano-ESI, a menudo utilizada en el análisis de péptidos y proteínas.

La ionización se puede llevar a cabo en modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$, donde n es el número de protones positivamente cargados en la molécula. Del mismo modo, es posible también la formación de aductos con iones de sodio, amonio, potasio, etc. En el modo negativo se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-nH]^{n-}$.

Los parámetros que se han de ajustar para una buena ionización de los analitos y, por tanto, para una mayor sensibilidad del análisis son, entre otros, y dependiendo del tipo de instrumento y fabricante (ver Figura 2.44.): voltaje de la aguja de nebulización (3); presión del gas de nebulización (2); temperatura (4) y caudal del gas de secado.

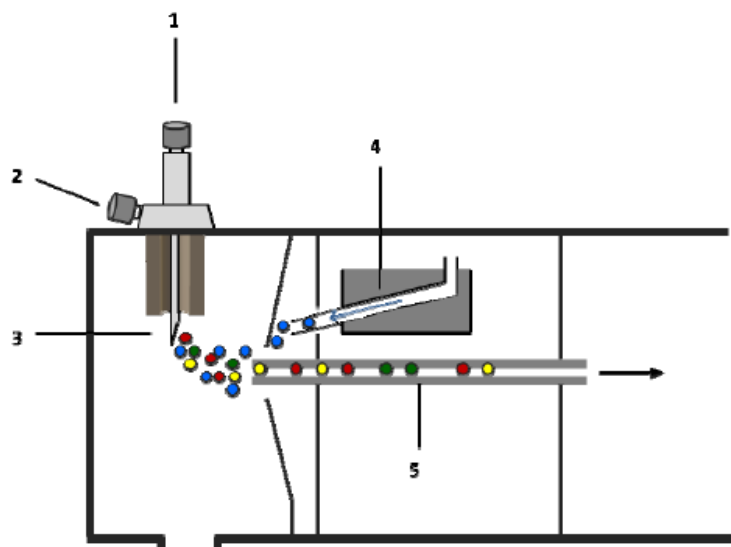


Figura 2.44. Esquema de una fuente ESI. 1: entrada del líquido (efluente HPLC); 2: entrada del gas de nebulización; 3: aguja de nebulización; 4: calentador del gas de secado; 5: capilar de vidrio a través del cual pasan los iones hacia el analizador.

Una gran ventaja de la fuente ESI es su aplicabilidad a analitos termosensibles, lábiles o no volátiles [151]. Los hidrocarburos, sin embargo no se ionizan mediante ESI. Las

aplicaciones de LC-ESI-MS cubren un amplio espectro de compuestos, de baja a alta masa molecular (plaguicidas, fármacos, proteínas, polímeros,...), siendo una técnica muy valiosa para la detección de compuestos de peso molecular medio. Se pueden citar, por ejemplo, la caracterización de péptidos y proteínas [152], el análisis cuantitativo de fármacos en aguas residuales [153], o el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos [154, 155].

Cuando se trabaja con electrospray en análisis cuantitativo de compuestos orgánicos presentes en los alimentos, un factor a tener en cuenta es el “efecto de la matriz”, esto es, el efecto que pueden tener las especies que acompañan a los analitos en el extracto del alimento cuando éstos últimos alcanzan la fuente de ionización. Estas especies pueden favorecer la ionización de dichos analitos o dificultarla, e incluso impedirla (supresión de la ionización) [156, 157]. Por lo tanto, una buena preparación de la muestra puede ser una etapa crucial en el análisis de alimentos mediante LC-ESI-MS.

- *Ionización química a presión atmosférica (APCI)* [146].

El efluente del HPLC es nebulizado y rápidamente evaporado mediante una corriente de nitrógeno coaxial en una cámara a alta temperatura (350 – 550 °C), de forma que el calor evapora el disolvente y los analitos. Aunque las elevadas temperaturas de trabajo pueden degradar los analitos, la alta velocidad de flujo del efluente del HPLC y el flujo de nitrógeno coaxial previenen la ruptura de las moléculas. Un electrodo de descarga de corona proporciona un haz de electrones que ionizan los gases de la fuente y los disolventes de la fase móvil. El plasma de iones generado será el responsable de la ionización en fase gas de los analitos. Las diferentes reacciones dependerán de la naturaleza del gas reactivo y del analito, fundamentalmente la afinidad protónica en modo positivo. En modo negativo, menos usual, el mecanismo de ionización es mediante la pérdida de un protón y/o captura de un electrón. Puesto que la formación de iones se produce en fase gas, no es apropiada para compuestos no volátiles o térmicamente lábiles. A diferencia del electrospray, APCI es una técnica que requiere

trabajar con altas velocidades de flujo del efluente del HPLC (≥ 1 mL/min), ya que una baja velocidad de flujo podría generar problemas en la estabilidad del electrodo de descarga de corona. Por lo tanto, APCI es menos susceptible de miniaturización.

Esta técnica de ionización ha sido aplicada fundamentalmente a compuestos con un peso molecular < 1000 Da, como fármacos, metabolitos, PAHs, plaguicidas, etc. Como ejemplos de la aplicación de LC-APCI-MS al análisis de residuos tóxicos, se pueden citar la determinación de lactosas macrocíclicas en hígado bovino [158], la determinación de residuos de plaguicidas en aguas [159], o la determinación de aminas heterocíclicas en carne liofilizada [160].

- *Fotoionización a presión atmosférica (APPI) [161].*

Formalmente sería una APCI iniciada por fotoionización. El proceso de fotoionización implica la absorción de energía radiante procedente de una fuente ultravioleta donde la energía incidente es mayor que el potencial de ionización (PI) para la pérdida de un primer protón por parte de la molécula de analito. Dicho proceso de fotoionización a presión atmosférica conduce generalmente a la producción de iones moleculares (M^{+}), observándose escasa fragmentación. La ionización no depende de reacciones en fase gaseosa ni de la química ácido-base, por lo que con APPI se pueden ionizar moléculas que no son ionizables por ESI o APCI o lo son con baja sensibilidad. La eficacia es relativamente pobre en algunos casos debido a la absorción de fotones por parte de los disolventes y otras especies.

- *Fuentes multimodales.*

Son dispositivos con más de una fuente de ionización (se suele combinar ESI y APCI en un solo sistema) y surgen con el objetivo de evitar duplicar inyecciones, especialmente en protocolos genéricos de caracterización de compuestos desconocidos.

Para el análisis de los iones moleculares y fragmentos cargados, existen varios tipos de analizadores de masas (ver Tabla 2.15.), de forma que la separación de los iones en función de su relación masa-carga se basa en distintos principios. Todos los

analizadores de masas usan campos eléctricos y/o magnéticos que pueden ser estáticos o dinámicos. La mayoría de las diferencias básicas entre los distintos tipos de analizadores reside en la forma en que se usan esos campos para conseguir la separación. Los analizadores de masas tienen distinto poder de resolución, que es un parámetro que se define como “la habilidad de distinguir las señales de dos iones que difieren muy poco en su relación masa/carga (m/z)”. Para aumentar su poder de resolución y su sensibilidad, así como para conseguir fragmentos de las moléculas de analito que conduzcan a una confirmación inequívoca de su presencia en la muestra sometida a análisis, se comercializan instrumentos híbridos que poseen varios analizadores de masas combinados.

Tabla 2.15. Tipos de analizadores de masas.

<i>Tipo de analizador</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Principio de separación</i>	<i>Llegada de los iones al detector</i>	<i>Resolución</i>
Sector eléctrico	E ó ESA	Energía cinética	Simultánea	Baja
Sector magnético	B	Momento magnético	Secuencial	Alta
Analizador de masas cuadrupolar	Q	m/z (estabilidad de la trayectoria)	Secuencial	Baja
Trampa de iones tridimensional	(Q)IT	m/z (frecuencia de resonancia)	Simultánea	Baja
Trampa de iones bidimensional o lineal	LIT	m/z (frecuencia de resonancia)	Simultánea	Baja
Tiempo de vuelo	TOF	Velocidad (tiempo de vuelo)	Simultánea	Alta
Resonancia de ion-ciclotrón por (E)formada de Fourier	FT-ICR	m/z (frecuencia de resonancia)	Simultánea	Alta
Orbitrap por (E)formada de Fourier	FT-OT	m/z (frecuencia de resonancia)	Simultánea	Alta

Una vez que los iones salen del analizador de masas, van hacia el detector. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie. Generalmente, se utiliza un cierto tipo de multiplicador de electrones (electromultiplicador). Brevemente se explicaran algunos de los analizadores más utilizados.

a. *Analizador de masas cuadrupolar (Q).*

Un cuadrupolo está formado por cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos [146]. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par se une al terminal negativo (ver Figura 2.45.). Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia que están desfasados 180 grados. Para obtener un espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras mediante un potencial de 5 a 10 V. Entre tanto, las tensiones de corriente continua y de corriente alterna se incrementan simultáneamente desde cero hasta un valor máximo, mientras se mantiene constante su relación. El tiempo para un solo barrido es de unos pocos milisegundos (< 100 ms). En cualquier momento, todos los iones excepto aquellos que tengan un determinado valor de m/z inciden en las barras y se convierten en moléculas neutras. Por tanto, sólo los iones cuyo valor de m/z esté dentro de un intervalo limitado alcanzarán al detector, de forma que un cuadrupolo actúa como un filtro de masas. Generalmente, los instrumentos cuadrupolares separan fácilmente iones que difieren en su masa una unidad, son de bajo coste y su electrónica puede ser controlada fácilmente (simplicidad de operación).

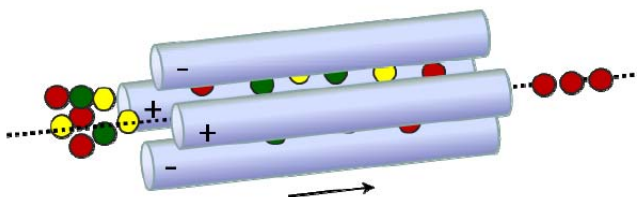


Figura 2.45. Esquema de un analizador de masas cuadrupolar.

b. *Trampa de iones tridimensional ó cuadrupolar ((Q)IT).*

Es un dispositivo en el que los iones en fase gas quedan confinados durante periodos de tiempo relativamente largos debido a la acción de campos eléctricos. Consta de un electrodo anular (o toroidal) y un par de electrodos colectores (uno de entrada y otro de

salida) [146]. Al electrodo anular se le aplica un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados a tierra. El haz de iones penetra a través de la rejilla del electrodo colector superior y los iones quedan confinados en el electrodo anular (ver Figura 2.46.). Se realiza entonces un barrido de radiofrecuencias creciente que provoca la desestabilización resonante de los iones confinados, que abandonan la cavidad anular secuencialmente a través de la rejilla del electrodo colector inferior, en un orden de m/z creciente. Los iones emitidos pasan seguidamente al detector. Una versión comercial corriente de este dispositivo es capaz de resolver iones que difieren en una unidad de masa en el intervalo de masas de 500 a 2000 Daltons.

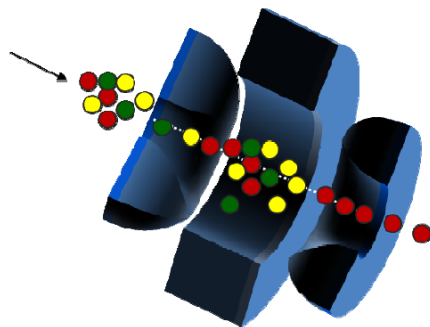


Figura 2.46. Esquema 3D (sección) de una trampa de iones cuadrupolar. Los iones son expulsados selectivamente hacia el detector.

Además de su mejorada sensibilidad en *full scan* con respecto a los cuadrupolos simples, los analizadores de trampa de iones permiten la obtención de espectros de masas en tándem (MS/MS) de una forma sencilla. La técnica de MS/MS consiste en seleccionar en el espectro *full scan* un ion selectivo del analito, al que se denomina ion precursor. Una vez seleccionado, éste es aislado en la trampa de iones, expulsándose de la misma, mediante la aplicación de campos eléctricos adecuados, los iones de masa inferior y superior. A continuación, mediante la aplicación de un campo eléctrico sinusoidal, los iones almacenados colisionan con el helio presente en la trampa

mediante un proceso conocido como disociación inducida por colisiones (*CID – collision induced dissociation*). Los iones producto así generados se expulsan de la trampa mediante la aplicación de una rampa de radiofrecuencia, registrándose el espectro de la segunda fragmentación (MS^2). Este modo de trabajo proporciona información estructural adicional, permitiendo la asignación de iones fragmento seleccionados, ya que es posible incluso repetir el proceso, aislándose de nuevo un ion producto para obtener espectros de MS^n . Sin embargo, en lugar de la elucidación estructural, el análisis por GC-MS/MS mediante trampa de iones de residuos de plaguicidas, se ha centrado en mayor medida en la identificación de compuestos objetivo en muestras complejas, dada su mayor selectividad que repercute en una mejora de la sensibilidad (en comparación con el modo *full scan*) [188-191]. Lo mismo sucede en el análisis de residuos de plaguicidas mediante LC-MS/MS [192-194].

c) *Tiempo de vuelo (TOF)*.

Los iones son acelerados (en la fuente de impulso o *pulser*) mediante un impulso de campo eléctrico de 103 a 104 V y una frecuencia de 10 a 50 kHz. Las partículas aceleradas pasan al tubo analizador (tubo de vuelo) de entre uno y dos metros de longitud, situado ortogonalmente a la fuente de iones y que no está sometido a ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo idealmente tienen la misma energía cinética, sus velocidades dentro del tubo deben variar inversamente con sus masas, llegando al detector antes las partículas más ligeras que las más pesadas [161]. Los tiempos de vuelo habituales van de 1 a 100 μs .

Variaciones en la energía de los iones y en las posiciones iniciales de los mismos causan un ensanchamiento de los picos que suelen limitar la resolución obtenida.

Algunas de las ventajas de este tipo de analizadores son: la sencillez, la robustez, facilidad de accesibilidad a la fuente de iones, un intervalo de masas virtualmente ilimitado y rapidez en la adquisición de datos. Otra característica interesante de los analizadores de tiempo de vuelo reside en su fácil calibración de masas (relación de

tiempos de vuelo con masas) con sólo uno o dos puntos de referencia (uno o dos compuestos de masa perfectamente conocida). La resolución de masa depende del “tiempo de vuelo” y de la longitud del tubo. Para aumentar la trayectoria recorrida por los iones y, por lo tanto, su “tiempo de vuelo”, se utiliza lo que se denomina reflectrón (*reflectron*), que consiste en una serie de electrodos anulares colocados en el extremo opuesto al detector y que actúan como un “espejo” para los iones (adquisición en modo V) (ver Figura 2.47.). El reflectrón ayuda a corregir las pequeñas variaciones en la energía cinética de los iones, evitando el efecto que esto puede ocasionar en la resolución. En algunos instrumentos, para aumentar aún más la resolución, se pueden utilizar dos reflectrones (adquisición en modo W).

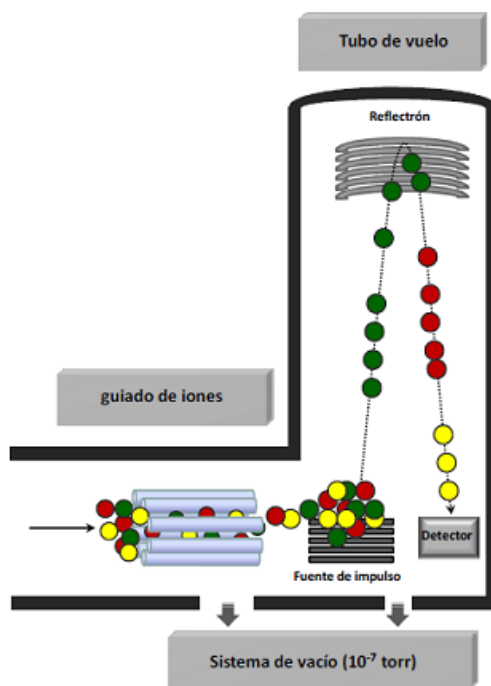


Figura 2.47. Esquema de un analizador de tiempo de vuelo operando en modo “V”.

La principal característica de los analizadores de tiempo de vuelo es la exactitud de masa que proporcionan, de hasta cuatro cifras decimales. Esto es posible gracias a la inyección constante durante el análisis de una disolución autocalibrante compuesta por uno o dos compuestos (dependiendo del fabricante) de masa perfectamente conocida. Recientemente se han desarrollado mejoras en el software de los instrumentos LC-MS con analizador de tiempo de vuelo que permiten la creación de bases de datos que proporcionan la identificación automática de los compuestos en base a su tiempo de retención y a su masa exacta. El acoplamiento LC-TOFMS también permite la detección de compuestos “no esperados” (*non target*) e incluso desconocidos (*unknowns*) para los cuales no se dispone de patrones analíticos a priori.

La obtención de espectros en *full scan* con gran exactitud de masa, que pueden ser procesados a posteriori para la identificación de compuestos no esperados en un principio y la posibilidad de enfrentar dichos espectros a una base de datos, han propiciado que en los últimos años los instrumentos LC-MS con analizador de tiempo de vuelo hayan sido ampliamente utilizados para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal [162, 163].

Los modos de trabajo típicos de los analizadores de masas, se detallan brevemente a continuación:

- *Full Scan*. El analizador separa todos los iones procedentes del eluyente de la columna cromatográfica según su relación m/z y los conduce hacia el detector, sin ninguna restricción.
- *Selected Ion Monitoring (SIM)*. Consiste en seleccionar la molécula protonada (en modo de ionización positivo) o deprotonada (en modo de ionización negativo) y al menos el fragmento más intenso. Estos iones son utilizados para la identificación del compuesto. Es una práctica común seleccionar al menos dos iones fragmento para la identificación de plaguicidas en alimentos. Este modo de trabajo requiere, por tanto, el conocimiento del compuesto que se está analizando. Este modo de trabajo se suele utilizar en los instrumentos de cuadrupolo sencillo.

- Los instrumentos de triple cuadrupolo poseen cuatro modos de trabajo en MS/MS, principalmente: *product-ion scan (PIS)*, *multiple reaction monitoring (MRM)*, *constant neutral loss* y *precursor-ion scan*. Estos cuatro modos de trabajo se corresponden con las cuatro combinaciones posibles entre los modos de operación de los cuadrupolos 1 y 3 (ver Tabla 2.16.). Cada uno de ellos puede operar en *full scan* o SIM. El cuadrupolo 2 (Q2) operará en todo momento como celda de colisión.

Tabla 2.16. Modos de trabajo MS/MS disponibles en un instrumento de triple cuadrupolo.

Modo de trabajo	Configuración Q1	Configuración
Product-ion scan	SIM iones precursores	Full Scan
Multiple reaction monitoring (MRM)	SIM iones precursores	SIM iones fragmento
Constant neutral loss	Full Scan	Full Scan
Precursor-ion scan	Full Scan	SIM iones fragmento

- *Product Ion Scan*. El primer cuadrupolo (Q1) selecciona el ion de interés de un analito o analitos de interés, y envía únicamente estos iones seleccionados (iones precursores) a la celda de colisión (Q2), donde serán fragmentados mediante CID. Todos los iones fragmento serán entonces enviados al tercer cuadrupolo (Q3), donde serán separados en función de su relación masa-carga previamente a su llegada al detector. De este modo, se obtiene el espectro de fragmentación de las especies de interés.
- *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*. A veces se denomina *selected reaction monitoring (SRM)*, y se basa en la selección de los iones de interés en el cuadrupolo 1 (iones precursores), los cuales serán enviados al segundo cuadrupolo para su fragmentación. Finalmente, los fragmentos característicos (iones fragmento o producto) de cada compuesto serán monitorizados en el cuadrupolo 3.
- *Constant neutral loss scanning*. En este modo de trabajo, Q1 y Q3 escanean todos los iones que les llegan sincronizadamente, de forma que se establece una diferencia de masa fija entre ambos cuadrupolos. Por lo tanto, el instrumento puede calcular la pérdida de masa que sufren los iones entre Q1 y Q3 (es decir, en la celda

de colisión Q2). Por ejemplo, si la pérdida de masa es de 50, mientras Q1 está escaneando a m/z 200, Q3 está escaneando a m/z 150. El valor de m/z 150 es registrado por el detector junto con el valor de m/z detectado en Q1 a ese mismo tiempo. Este modo de trabajo es muy útil para la identificación de ciertas familias de compuestos, como las triazinas, que sufren una pérdida común de propileno (m/z 42). Hasta hace muy poco, sólo los instrumentos de triple cuadrupolo tenían la habilidad de trabajar en *constant neutral loss scanning*, pero recientemente se han desarrollado instrumentos Q-TOF que también ofrecen esta posibilidad.

- *Precursor Ion Scan*. Q1 opera en modo scan mientras que Q3 selecciona uno o varios iones específicos generados en la celda de colisión (Q2) y que son monitorizados en el detector. Cuando el ion de interés es detectado en Q3, el valor de m/z encontrado en ese momento en Q1 es registrado en conjunción con la intensidad registrada por el detector. Este modo de trabajo se utiliza para la identificación del ion precursor cuando los iones fragmento producidos en la celda de colisión pueden pertenecer a varios compuestos de una misma familia.

En una trampa de iones (tanto lineal como cuadrupolar), es el mismo analizador el que primero actúa como filtro, luego como cámara de colisión y por último como filtro separador de masas (pudiendo ser registrados todos los fragmentos obtenidos o sólo unos pocos seleccionados por su abundancia). Por lo tanto, en un análisis MS/MS una trampa de iones permite trabajar en los modos SIM y PIS.

2.13.2.5. Cromatografía de líquidos / espectrometría de masas

Según trabajos de investigación para la determinación de los productos de degradación de plaguicidas, la técnica analítica más adecuada es la LC-MS/MS [164], lográndose la identificación de una gran variedad de intermedios de degradación, como alternativa a la GC-MS/MS, que suele presentar limitaciones en compuestos de carácter polar, poco volátiles y termolábiles.

El primer acoplamiento entre LC y MS fue descrito hace unos 25 años, en el se combinaba un instrumento de LC con un MS, que presentó ciertas dificultades, las cuales han retrasado el uso generalizado de esta técnica hasta la última década, en la que se han desarrollado fuentes de ionización a presión atmosférica ESI (Fuente de ionización Electrospray) y APCI (Ionización química a presión atmosférica), fiables y robustas. Esto ha hecho que el acoplamiento LC-MS/MS sea la principal técnica empleada para la identificación y cuantificación de plaguicidas y otros compuestos polares y termolábiles en el ambiente y alimentos.

El papel principal de los LC-MS en los estudios de degradación de plaguicidas consiste en [165] :

- i) Comprobar la relación masa/carga (m/z) de los PDs y la composición elemental si se dispone de un equipo de alta resolución.
- ii) Detectar los PDs que no son directamente detectables mediante técnicas GC-MS.

La principal ventaja de la ionización mediante ESI, es que se obtienen espectros de masas muy sencillos, principalmente constituidos por iones de la molécula intacta (M) sin fragmentar, bien protonados ($[M+H]^+$) o desprotonados ($[M-H]^-$), en función de que se opere en modo de ionización positivo o negativo respectivamente. Esta característica de los espectros ESI, facilita la tarea de elucidar productos de degradación, cuando se combina con espectrometría de masas de alta resolución, ya que se puede deducir la composición elemental de la especie identificada de forma inequívoca, incluso cuando ésta se encuentra a bajas concentraciones.

2.13.2.6. Cromatografía de gases / espectrometría de masas

Es una técnica ampliamente empleada en el análisis de residuos de plaguicidas, en particular para compuestos volátiles. Inicialmente, se emplearon columnas empaquetadas con fases estacionarias como las methyl siliconas, methyl-fenil siliconas

y fluoropropil siliconas. En los últimos años, predomina claramente la utilización de columnas capilares, ya que presentan una mayor sensibilidad y resolución que las empaquetadas y, por tanto, permiten conseguir mejores límites de detección.

En los últimos años, la GC-MS, se ha implantado en la determinación de plaguicidas. Tanto es así, que en la UE es un requisito que la espectrometría de masas sea la técnica empleada para la confirmación de residuos de plaguicidas en alimentos de origen animal en los laboratorios autorizados para el control oficial de residuos, según la decisión de la Comisión 2002/657/CE. Con esta técnica se puede detectar la masa característica de un compuesto y seleccionando dicha masa, puede detectarse selectivamente ese compuesto de interés en una matriz compleja. De esta manera se pueden determinar e identificar residuos de plaguicidas a niveles de concentración muy bajos. La adquisición de datos se puede llevar a cabo de dos modos distintos, cuando se trabaja en el modo de barrido (*full scan*), se detecta un intervalo de masas, mientras que si se trabaja en el modo SIM (*selected ion monitoring*) solamente se consideran las masas características de los compuestos de interés, lo que incrementa la sensibilidad entre 5 y 100 veces cuando se trabaja de este modo, ya que aumenta el tiempo de medida.

En la actualidad también se está empleando la GC-MS/MS, donde se acopla un espectrómetro de masas a otro, una técnica mucho más sensible y selectiva que la anterior. En el primer espectrómetro, equipado con una fuente de ionización que dé lugar a poca fragmentación, como es la ionización química, se aíslan los iones moleculares o los iones moleculares protonados de los distintos componentes de una mezcla. En el segundo espectrómetro estos iones son fragmentados para dar una serie de espectros de masa, uno por cada uno de los iones moleculares obtenidos en el primer espectrómetro, consiguiendo de esta manera una selectividad y sensibilidad elevadas.

Uno de los primeros detectores que se utilizaron en cromatografía de gases, y uno de los que todavía tiene una gran aplicación, es el detector de conductividad térmica (TCD),

basado en los cambios en la conductividad térmica de una corriente de gas (generalmente helio o hidrógeno), ocasionados por la presencia de analito. Las ventajas del detector de conductividad térmica son su sencillez, su amplio intervalo dinámico lineal y su respuesta universal tanto a especies orgánicas como inorgánicas. Una importante limitación de este detector es su baja sensibilidad.

- El detector de ionización de llama (FID) es el detector más extensamente utilizado, y por lo general, uno de los más aplicables en cromatografía de gases. Se fundamenta en la mezcla del efluente de la columna con hidrógeno y aire en un quemador. La mayoría de los compuestos orgánicos cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire forman iones que son conducidos mediante una diferencia de potencial hacia un electrodo colector.
- El detector de captura de electrones (ECD) ha llegado a ser uno de los detectores más ampliamente utilizados para el análisis de muestras medioambientales, debido a su selectividad para detectar compuestos que contienen halógenos, como es el caso de los plaguicidas y bifenilos policlorados. Este detector se fundamenta en la ionización del gas portador (generalmente nitrógeno) y la producción de una ráfaga de electrones, de forma que se generará una corriente eléctrica constante, que se verá alterada por la presencia en el efluente de la columna de especies altamente electronegativas como los halógenos (debido a su tendencia a capturar electrones). Los detectores de captura de electrones son altamente sensibles, pero su intervalo de respuesta lineal se limita normalmente a dos órdenes de magnitud.
- El detector termoiónico (TID ó NPD) es un detector selectivo de los compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno, siendo particularmente útil para la determinación de muchos plaguicidas organofosforados. El fundamento de este detector es similar al del detector de ionización de llama.

3. ANTECEDENTES



3. ANTECEDENTES

3.1. Tecnologías para la degradación de contaminantes químicos en alimentos

Los alimentos, proceden de plantas y animales, presentan una serie de transformaciones, ya sean físicas, químicas, bioquímicas y microbiológicas, o combinaciones de dos o más de éstas que llegan a producir deterioro, es decir, la pérdida de atributos nutricionales y sensoriales.

Por ello, es necesario realizar una búsqueda de metodologías que sin perjudicar la naturaleza de los alimentos, realicen la degradación de contaminantes, como son los plaguicidas, para ello se está llevando a cabo el nacimiento de tecnologías emergentes, las cuales tienen la finalidad de eliminar o minimizar a los residuos plaguicidas presentes en ellos.

3.1.1. Campos eléctricos pulsados de alta intensidad

Los campos eléctricos pulsados es un sistema para la conservación de alimentos no térmico, con pequeñas pérdidas en sus características organolépticas y nutricionales [166]. Consiste en una repetición sucesiva de pulsos de corta duración (325µs) y flashes de alta potencia emitida por las lámparas de xenón. Estas lámparas de destellos emiten una emisión de luz de banda ancha (aprox. 200 a 1000 nm) con una considerable cantidad de luz en el espectro UV de onda corta. Esta tecnología se ha probado para la degradación del herbicida atrazine en el agua [167].

La utilización de PEF (*Pulsed electric fields*), es un sistema compuesto principalmente de los siguientes elementos: una fuente de alto voltaje, un banco de capacitores, un interruptor de alto voltaje y una cámara de tratamiento, equipo patentado por Zhang en 1999 [168], ver Figura 3.1. La utilización de PEF en zumo de manzana, muestra una considerable degradación del diazinon y dimethoate. El grado de degradación se ve

fuertemente influenciada por la intensidad de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, la degradación máxima de dos plaguicidas es diazinon (47,6%) y para el dimethoate (34,7%). En la degradación del methamidophos y chlorpyrifos en zumo de manzana, se demostró que la degradación de éstos compuestos eran del 27.7% y 70.3%, respectivamente [169].

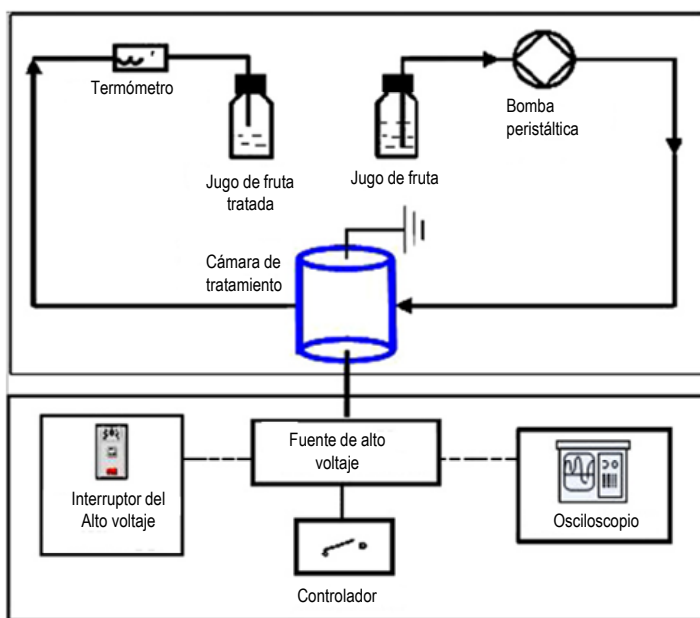


Figura 3.1. Diagrama esquemático del aparato experimental PEF [170].

3.1.2. Sonoquímica o ultrasonido

Se define como el desarrollo de reacciones químicas que incluyen la presencia de una fase líquida, utilizando como fuente de energía el ultrasonido. Los tratamientos sonoquímicos se basan en la aplicación de campos de ultrasonidos al efluente, con una frecuencia entre los 20 kHz y 2 MHz (Figura 3.2.). Entre los diversos fenómenos que aparecen en el seno del agua cuando se propaga un campo de ultrasonidos destaca la

cavitación ultrasónica. La cavitación ultrasónica es la formación, crecimiento y explosión de burbujas en el seno del líquido (Figura 3.3.), en un intervalo corto de tiempo (milisegundos) y libera gran cantidad de energía.

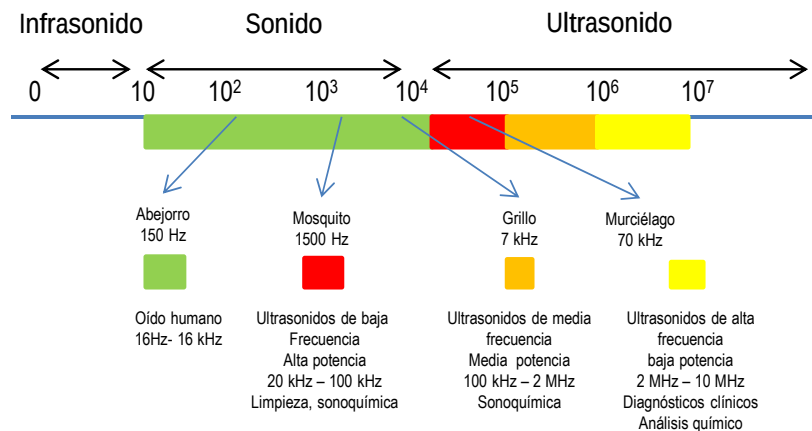


Figura 3.2. Intervalos de frecuencia acústica.

La aparición del fenómeno de la cavitación depende principalmente de la frecuencia y de la potencia del campo de ultrasonidos. Durante este proceso se llegan a generar, localmente y en tiempo muy corto, temperaturas cercanas a las del sol y presiones extremadamente altas, condiciones que permiten llevar a cabo reacciones químicas extremadamente difíciles [171].

Una disolución acuosa en la que tiene lugar la cavitación puede asimilarse a un entorno repleto de microrreactores químicos (las burbujas cavitando) en donde tiene lugar, al menos, la sonólisis del agua, es decir, la ruptura homolítica de la molécula en radicales $\text{OH}\cdot$ y $\text{H}\cdot$, altamente reactivos. La participación posterior de estos radicales, especialmente los radicales $\text{OH}\cdot$, en la oxidación de moléculas tóxicas y peligrosas que se pudieran encontrar en disolución, permite augurar una eliminación de este tipo de contaminantes sin la necesidad de utilizar reactivos extra que pueden ser peligrosos, ni condiciones extremas de temperatura o presión [172].

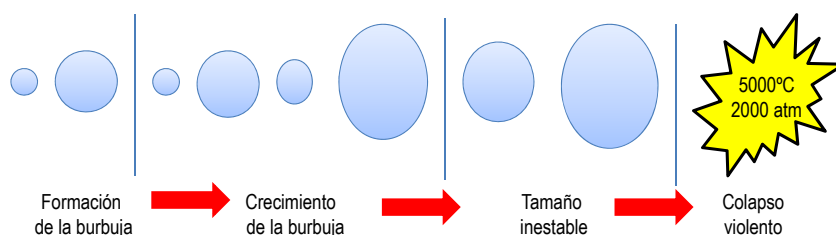


Figura 3.3. Desarrollo y colapso de una burbuja cavitacional bajo un campo de ultrasonidos.

Investigaciones realizadas para la degradación de residuos de diazinon, en zumo de manzana, demuestran que aplicando el ultrasonido (500W) después de 30 minutos con el tratamiento se degradada el 51.3% [173]. Con este sistema fue efectiva la degradación del malathion y chlorpyrifos, tratados a diferentes potencias ultrasónicas, en el jugo de manzana, obteniéndose como degradaciones máximas para el malathion (41,7%) y clorpyrifos (82,0%) después del tratamiento ultrasónico a 500W por 120 min [170].

3.1.3. Ozonización

El ozono es un potente agente oxidante, capaz de reaccionar con un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos. Su alto potencial de oxidación 2.07 E°(V) y la ausencia de la formación de subproductos peligrosos durante el proceso han hecho crecer la importancia de esta técnica en el tratamiento de aguas durante la pasada década. El principal inconveniente es la necesidad de generación de ozono a partir de oxígeno, para lo cual se emplea una descarga eléctrica sobre una corriente de aire u oxígeno puro. Este paso consume grandes cantidades de energía lo que hace muy cara su extracción. En la Figura 3.4., se esquematiza la aplicación del ozono en la purificación del agua.

El mecanismo de oxidación mediante ozonización, es un proceso complejo que tiene lugar por dos vías: reacción directa con el ozono disuelto (O_3) o la oxidación indirecta a

través de la formación de radicales ($\text{OH}^\cdot$). La intensidad de ambos mecanismos durante la degradación de un compuesto depende de factores como la naturaleza del contaminante, la dosis de ozono o el pH del medio.

El proceso de ozonización (O_3), se ha utilizado como un método eficaz para la eliminación de residuos de plaguicidas en el agua durante tratamiento de agua potable y de productos agrícolas como zumos de frutas [174]. Algunos plaguicidas que se degradan por la ozonización son los que contienen en su estructura S, N, O y Cl, ya que el ozono reacciona con dichos átomos [175].

El uso de ozono (O_3) es un método prometedor para reducir los residuos de chlorpyrifos en las frutas frescas de litchi (fruto tropical) [176]. Se ha demostrado también que el uso de ozono disuelto (1,4 mg/L) durante 60 minutos reduce eficazmente methyl-parathion, cypermethrin, diazinon y parathion en solución acuosa [177]. Se han tratado de degradar también por este método los piretroides como el permethrin, en el que se degradó hasta un 65% en disoluciones acuosas [107].

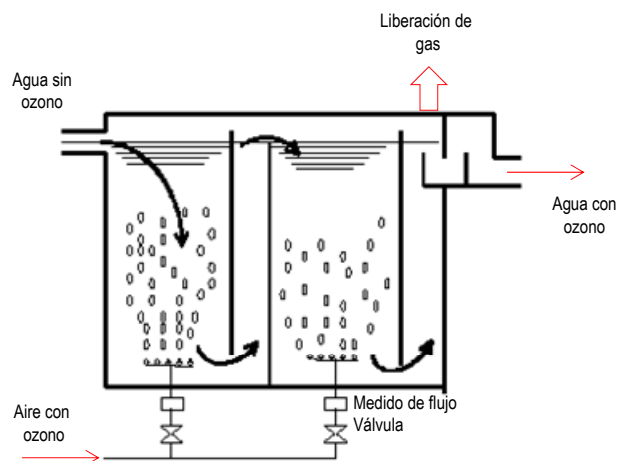


Figura 3.4. Aplicación de ozono en la purificación de agua.

3.1.4. Combinación de ozonización y ultrasonido

La combinación del tratamiento de ozonización y ultrasonido (US/O₃), (Figura 3.5.), ofrece varias ventajas sobre el proceso individual. La principal ventaja es el aumento de la transferencia de masa de la capa de ozono de la fase gaseosa a la solución para reaccionar con el sustrato por efectos mecánicos de los ultrasonidos. Las burbujas del ultrasonido inducen a la descomposición de O₃ en condiciones suaves que producen O₂ molecular y oxígeno triplete atómica, $\bullet\text{O}$ (³P) [178, 179]. En el sistema combinado, US/O₃, se cree que mejora el uno al otro en la oxidación de contaminantes orgánicos.

En investigaciones realizadas en frutas (manzanas: piel y pulpa), para la degradación de plaguicidas, utilizando el proceso de ozono – ultrasonido se mostró una mayor degradación de los plaguicidas utilizando solo ozono o bien ultrasonido [180]. El US/O₃, aplicados en combinación tiene un efecto sinérgico en la reducción de la concentración de chlorpyrifos en disoluciones acuosas [181].

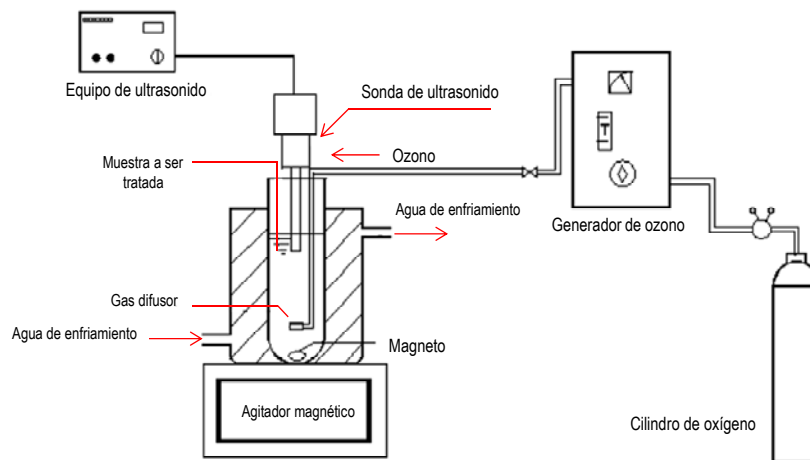


Figura 3.5. Tratamiento del agua con US/O₃ [179].

3.1.5. Radiación ultravioleta

Se denomina radiación ultravioleta o UV, a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400 nm ($4 \times 10^{-7} \text{ m}$) y los 15 nm ($1,5 \times 10^{-8} \text{ m}$). La Figura 3.6. se muestran los espectros de la radiación electromagnéticas y los diferentes subtipos en que se divide.

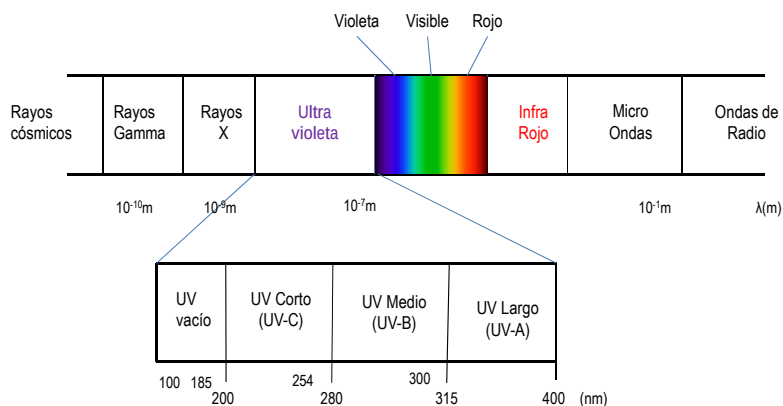


Figura 3.6. Espectro de la radiación electromagnética.

Para producir cambios fotoquímicos en una molécula, el sistema debe irradiarse con luz de energía en el rango UV-visible. El espectro visible cubre longitudes de onda entre 400 y 800 nm. El rango UV se divide usualmente en cuatro regiones, UV-A (llamada también luz UV cercana, larga o negra), UV-B (onda media), UV-C (luz UV corta) y luz UV (luz ultravioleta de vacío), tal como muestra la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Rangos de la radiación UV, según su longitud de onda.

Nombre	Abreviación	Longitud de onda (nm)	Energía por fotón (eV)
Ultravioleta cercano	UV	400 – 200	3.10 – 6.30
Onda larga	UV-A	400 – 320	3.10 – 3.87
Onda media	UV-B	320 – 280	3.87 – 4.43
Onda corta	UV-C	280 – 200	4.43 – 6.20
Ultravioleta lejano	FUV, VUV	200 – 10	6.20 – 124.00
Ultravioleta extremo	EUV, XUV	91,2 – 1	13.6 – 1240.00

Debido a sus características y a su acción sobre las células, esta radiación natural puede emplearse para la desinfección de superficies y alimentos, aplicándose una cierta intensidad de rayos UV. Para su utilización se requieren equipos específicos que permitan incrementar la cantidad e intensidad de la radiación.

En la actualidad, en la industria alimentaria, se utiliza el tratamiento con luz UV (254 nm), empleando un sistema continuo, con unos emisores de radiación, que se encuentran encendidos permanentemente. Se aplica tanto en alimentos líquidos o en polvo. No obstante, tampoco en todos los casos se consigue una eficacia adecuada, sobre todo en alimentos sólidos [114]. En la industria alimentaria se utiliza para la desinfección, por la exposición de alimentos, usándose para prolongar la vida útil de los productos alimenticios y/o para reducir riesgos de peligro para la salud asociados con ciertos productos debido a la presencia de microorganismos patógenos.

El tratamiento se puede aplicar para diferentes propósitos, tales como:

1. Prevención de la germinación y crecimiento de las patatas, las cebollas y el ajo.
2. Desinfección o esterilizar insectos que infestan los granos, frutos secos, verduras o frutos secos.
3. Retraso de la maduración y el envejecimiento de frutas y verduras.
4. La prolongación de la vida útil y la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos, al reducir el número de microorganismos viables presentes en la carne, aves y mariscos.
5. Reducción de microorganismos en especias y hierbas.

En la práctica, el uso de esta técnica es bastante limitada a pesar de que está autorizada en muchos países.

Los reglamentos para el uso del proceso de irradiación UV, en la UE no existen aún, los Estados miembros aún discuten, que alimentos deberían ser autorizados a tratar con

radiación ionizante. Además, se están trabajando en una estrategia que se propone para la elaboración de una lista positiva. La irradiación de alimentos sólo podrá autorizarse si hay una necesidad tecnológica suficiente, no presenta ningún riesgo para la salud y se lleva a cabo bajo las condiciones propuestas, es beneficiosa para el consumidor, no se utiliza como un sustituto para la higiene y las prácticas de salud o para fabricación o agrícolas correctos. Hasta ahora la irradiación de alimentos en la UE, sólo está autorizado para las hierbas y especias. Pero las autorizaciones nacionales de los Estados miembros que permiten la irradiación de algunos alimentos, se puede mantener hasta que la lista positiva completa entre en vigor. La irradiación está permitida en Francia (para los camarones), Bélgica (para las ancas de rana), Países Bajos (para aves de corral), Italia (para las patatas) y Gran Bretaña (para las cebollas).

a. Lámparas UV de baja presión

Las lámparas de baja presión están diseñadas para operar a su óptima eficiencia con una temperatura de 40°C en la pared de lámpara y una potencia de arco eléctrico cercana a 0.3 W/cm. Bajo estas condiciones, la presión del vapor de mercurio dentro de la lámpara es de 0.9 Pa y la mayor parte del mercurio dentro de la lámpara se encuentra en estado líquido. La construcción, llenado, y operación de una lámpara de baja presión se eligen de manera tal, que se maximice la conversión de energía eléctrica a radiación UV-C a 254nm y 385nm, tal como se observa en la Figura 3.7.

Así, un 35% a 40% de la energía emitida por la lámpara UV de baja presión se convierte en luz UV-C, incluidas las pérdidas del balasto [182].

Una lámpara de baja presión estándar de 40 watts tiene una eficiencia del 40%, mientras que una lámpara UV de amalgama de baja presión y alta Intensidad, posee una eficiencia del 35%.

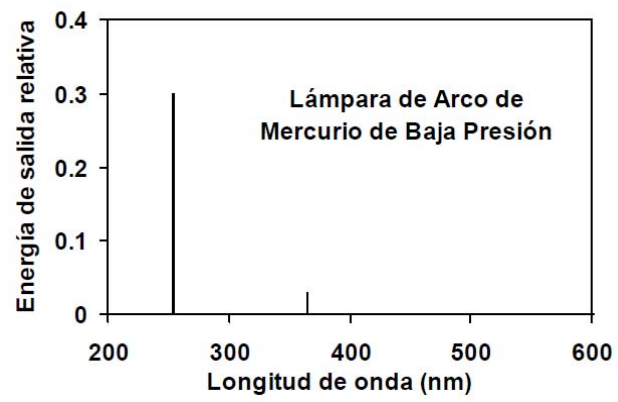


Figura 3.7. Salida espectral de lámparas de arco de mercurio de baja presión.

b. Lámparas UV de media presión

Durante la fabricación de la lámpara, se le introduce una masa medida de mercurio (1,4 a 15 mg Hg/cm de longitud del arco). Las lámparas están diseñadas para operar a una potencia de arco eléctrico relativamente alta. De igual manera, la temperatura de pared de la lámpara es muy alta y todo el mercurio dentro de la lámpara se vaporiza a una presión de vapor cercana a 13 KPa. Debido a la alta temperatura del plasma dentro de la lámpara de mediana presión, el mercurio vaporizado se encuentra en varios estados de excitación. El paso de estos niveles de excitación a un nivel de energía menor da como resultado la liberación de luz con diferentes longitudes de onda. En consecuencia, la salida espectral de una lámpara de mediana presión consiste de numerosos picos con un continuo de UV por debajo de 245 nm. (ver Figura 3.8.).

En la actualidad, las lámparas de media presión han mejorado de manera importante su eficiencia, llegando éstas a convertir entre el 15 y el 16% de la energía emitida en UVC germicida [182]. El resto de la energía produce otras frecuencias de luz visible y calor (frecuencias infrarrojas).

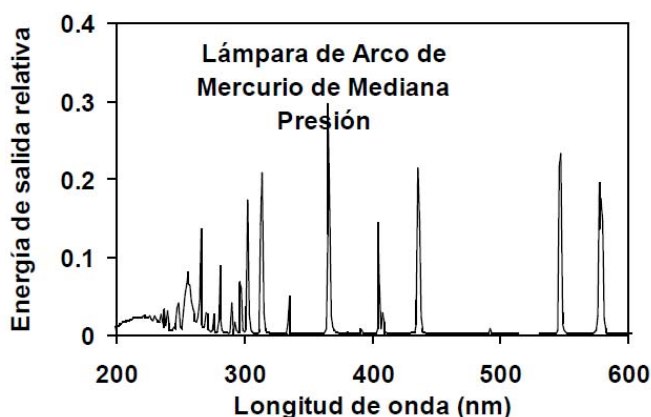


Figura 3.8. Salida espectral de lámparas de arco de mercurio de media presión.

Este último método, conocido como radiación UV de media presión, es el utilizado en la presente tesis, el cual pretende sentar las bases para la aplicación de esta nueva tecnología emergente para la degradación de plaguicidas.

Fotólisis mediante radiación ultravioleta (UV)

El término fotólisis tiene como significado la descomposición de una sustancia por la acción de la luz visible o ultravioleta. Los métodos fotolíticos para la degradación de contaminantes disueltos en agua se basan en proporcionar energía a los compuestos químicos en forma de radiación, que es absorbida por las distintas moléculas para alcanzar estados excitados en el tiempo necesario para experimentar reacciones [120].

La presencia de radiación ultravioleta, produce la fotólisis de un gran número de compuestos orgánicos. El proceso tiene lugar en el dominio del ultravioleta de onda corta - UVC (200-280 nm) y se basa en la formación de radicales centrados; es decir, radicales libres (Ecuación 3.1.)



$h\nu$: Es el fotón absorbido
 A^0 : La molécula en estado excitado

En los procesos de oxidación fotolíticos normalmente se utilizan lámparas de mercurio de baja presión (254 nm, 471 KJ/mol) empleadas tanto en la desinfección como en la depuración de aguas. Sin embargo es necesario valores de longitudes de onda más bajas (170-200 nm), ya que llevan asociada una mayor energía (704 – 598 KJ/mol) y son más eficientes en la ruptura de los enlaces de los compuestos orgánicos [183].

La energía radiante es absorbida por las moléculas en forma de unidades cuantizadas denominadas fotones, los cuales contienen las cantidades de energía requeridas para excitar electrones específicos y formar radicales libres que experimenten una serie de

reacciones en cadena para dar los productos de reacción. Estos radicales libres pueden generarse por homólisis (enlace covalente, que se rompe de manera equitativa) de enlaces débiles, o bien por transferencia electrónica desde el estado excitado de la molécula orgánica hacia el oxígeno molecular, originándose el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o hacia otros reactivos químicos como el ozono o el peróxido de hidrógeno, produciéndose radicales hidroxilo ($\cdot OH$); estos métodos fotolíticos utilizan radiación UV debido a la mayor energía de sus fotones como indica la ecuación de Planck (Ecuación 3.2.) [120].

$$W\lambda = \frac{hc}{\lambda} \quad (\text{Ecuación 3.2.})$$

Donde,

- $W\lambda$: energía de un fotón asociada a la longitud de onda;
- λ : longitud de onda de la radiación;
- h : constante de Planck;
- c : velocidad de la luz.

Se deben considerar tres aspectos fundamentales en el momento de decidir la conveniencia de un determinado método fotolítico [120]:

- Capacidad de absorber radiación de la longitud de onda incidente por parte de los compuestos a degradar.
- Rendimiento cuántico de los mismos.
- Estabilidad y simplicidad de los productos de fotodegradación.

La eficiencia de la degradación de compuestos a partir de la luz absorbida se mide a través del rendimiento cuántico (Φ), que se define como “*la relación entre el número de moléculas que reaccionan y el número de fotones absorbidos*”, existiendo propuestas de método de competición y métodos basados en diversos modelos de radiación para su cálculo [120].

La luz solar puede, por lo tanto usarse, pero debe tenerse en cuenta que en el espectro solar sólo está presente un 3-5% de luz UV [184]. La radiación ultravioleta por si misma (fotólisis), presenta una baja eficiencia en la degradación de compuestos orgánicos disueltos en agua en comparación con otros procesos que implican la generación de radicales hidroxilo. Aun así, existen estudios basados en la generación de radiación UV de 254 nm mediante lámparas (de mercurio de baja y media presión o arcos de Xe/Hg). Atrazine, simazine y parathion son algunos ejemplos de plaguicidas que han sido degradados mediante radiación de 254 nm [185]. Igualmente, diversas estructuras han sido degradadas mediante irradiación directa con luz solar [106] y otros compuestos han sido transformados en derivados de menor toxicidad mediante la aplicación de radiación UV en presencia de oxígeno [108].

Por otra parte, es conocida la capacidad de desinfección de la radiación ultravioleta, lo que resulta de gran interés para mejorar la calidad de las aguas [186].

3.2. Monitoreo de plaguicidas en aceite de oliva

En investigaciones realizadas [187, 188], se han publicado resultados sobre el estudio de muestras de aceite crudo (aceite sin refinar) de diferentes semillas (girasol, colza), en el que encontraron residuos de insecticidas, tales como el malathion, pyrimifos-methyl y diclorvos (insecticidas organofosforados utilizados para el almacenamiento) y los aceites refinados, niveles relativamente bajos comprendida entre 0,1 y 0,25 mg/Kg y los niveles máximos de hasta 1 mg/Kg. Los resultados mostraron que todos los aceites crudos contenía al menos un residuo de un plaguicida mayor que el límite de cuantificación.

El proceso de extracción de aceite de oliva virgen, la aceituna utilizadas trae consigo del campo algunas sustancias solubles en agua, como plaguicidas, tales como el dimethoate, methamidophos, omethoate y phosphamidon pasan a la fase acuosa en la extracción de aceite a partir de aceitunas [189, 190] y sólo un pequeño porcentaje es transferido al aceite (por ejemplo 6,3-8,8% para el dimethoate) en función del agua y

para la extracción del aceite en función de las aceitunas a utilizar [191]. Otros plaguicidas con menor solubilidad al agua (azinphos-methyl, buprofezin, chlorpyrifos, fenthion, deltamethrin, diazinon, endosulfan, quinalphos, α -cihalotrina, methidathion, parathion-methyl) se encontraron en el aceite con un factor de concentración de 2-7 [117, 190-192].

El lavado es uno de las principales vías de contaminación de los alimentos por plaguicidas, en el que se lleva a cabo la disolución de residuos de plaguicidas en el agua de lavado o aclarado con los baños químicos, (Holland, 1994) aunque el objetivo es la eliminación de las partículas de polvo o residuos de suelo del fruto [190, 193, 194].

Otro de los principales procesos desarrollados para la extracción del aceite de oliva es la adición de agua en la extracción, en el que se encontró que tiene un doble efecto sobre la concentración de plaguicidas: (i) aumentar los rendimientos de aceite y en consecuencia, la transferencia de los plaguicidas liposolubles y (ii) la disminución de los plaguicidas con alta solubilidad [191].

3.2.1. Metodología para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva

La determinación de residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos (por ejemplo organofosforados, carbamatos y triazinas) en muestras grasas requiere diferentes etapas de preparación de muestra, básicamente extracción y limpieza (*clean up*) o purificación de los extractos. Debido a la gran cantidad de grasa que posee esta matriz, los métodos de análisis de residuos de plaguicidas en aceite de oliva suelen ser muy laboriosos y es de suma importancia ya que la presencia de pequeñas cantidades de grasa provoca el deterioro de los equipos.

En la Tabla 3.2. se muestran algunos tratamientos y técnicas de determinación de diferentes plaguicidas encontrados en aceite de oliva. De aquí, la necesidad de implementar programas efectivos de vigilancia de la calidad del aceite de oliva.

Tabla 3.2. Analitos, tratamiento de muestra y técnica de determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva.

<i>Analito</i>	<i>Tratamiento de muestra / Técnica de determinación</i>	<i>Concentración Rango LOD</i>	<i>Ref.</i>
18 Organoclorados	SPE GC-ECD	≤0.01 mg/Kg	[195]
7 piretroides (cypermethrin, deltamethrin, fenclerater, cyhalothrin y permethrin)	SPE con carbón grafitizado en cartuchos	≤0.002 mg/L	[196]
17 Plaguicidas organofosforados	GPC GC-NPD	0.005–0.01 mg/Kg	[197]
13 Plaguicidas organofosforados	Extracción líquido/líquido CG/NPD	0.0001–0.001 mg/Kg	[190]
15 Plaguicidas organofosforados	SPE GC-ECD	<0.020 mg/kg	[198]
Endosulfan y 5 piretroides	GC-ECD	0.02–0.05 mg/Kg	[199]
18 organofosforados	SPE GC-NPD	0.001–0.02 mg/Kg	[200]
Dimethoate y fenthion	GC-Q-MS (SIM) GC-NPD	N/A	[201]
30 plaguicidas (organoclorados, organofosforados, triazinas, piretroides, etc.)	GC-Q-MS (SIM) LC-Electrospray-Q-MS (SIM)	N.D.	[202]
7 Plaguicidas organofosforados	HS-SPME GC-FID	5–10 µg/L	[203]
Carbaryl, simazine, lindane, diazinon, fenitrothion, terbutryn y parathion	RPLC GC-FID	0.1–0.3 mg/L	[119]
15 Plaguicidas organofosforados	GC-NPD GC – FID	0.0001–0.001 mg/Kg	[118]
Amitrole, dimethoate y diuron	HPLC-MS/ES (ESI+)	≤ 0.01 mg/Kg	[204]
Piretroides (tetramethrin, bifenthrin, phenothrin, cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, flucythrinate, esfenvalerate, fluvalinate y deltamethrin)	SPE GC-MS/MS	0.0003–0.001 mg/Kg	[205]
Plaguicidas organoclorados y organofosforados	SPE GC-NPD GC-ECD GC-MS/MS	0.001–0.025 mg/Kg	[206]
Triazinas, organofosforados, organoclorados y piretroides	GC-Q-MS (modo SIM) LC- electrospray – MS/MS	(LC–MS): 0.0002–0.03 mg/Kg; (GC–MS): 0.003–0.06 mg/Kg	[207]
<i>Analito</i>	<i>Tratamiento de muestra</i>	<i>Concentración</i>	<i>Ref.</i>

	<i>/ Técnica de determinación</i>	<i>Rango LOD</i>	
Diquat y paraquat	LC – electrospray (+)-QQQ-MS/MS	0.004 mg/Kg	[208]
35 plaguicidas	SPE GC-ECD GC-NPD	0.002–0.05 mg/Kg	[209]
Simazine, atrazine, diuron y terbutylazine	MSPD LC-Electrospray TOF/MS	0.001–0.005 mg/Kg	[210]
26 plaguicidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos	GC-MS/MS (CI Y EI)	0.0003–0.03 mg/Kg	[211]
13 plaguicidas organofosforados (dimethoate, diazinon, fenitrothion, malathion, fenthion, parathion ethyl, methyl bromophos, methidathion, ethion)	HS-SPME GC-FID	<0.01 mg/Kg	[212]
Organofosforados, organoclorados, piretroides y triazinas	SPE GC-ECD GC-NPD	0.002–0.05 mg/Kg	[209]
Simazine, terbutylazine, endosulfan I y II, cypermethrin y deltamethrin	GPC, SPE, MSPD, QuEChERS GC/FID, NPD y ECD, GC-MS/MS LC-MS	0.003-0.008 mg/Kg	[213]
Organophosphorus: Fenitrothion, parathion, diazinon, chlorpyrifos, methylchlorpyrifos, malathion, phenthoate, ethion, Triazina: simazine, Organoclorados: endosulfan I, Endosulfan II, endosulfan sulphate, Lindane	RPLC -GC TOTAD GPC – SPE – SFE- SPME- MSPD	NPD detector: 0.001–0.09 mg/L y ECD detector: 0.001–0.09 mg/L	[214]
Simazine, atrazine, propazine, terbutylazine, diuron, oxyfluorfen, diflufenican y norflurazone	GC–MS/MS	0.04–0.05 mg/Kg	[215]
100 plaguicidas	GC-MS/MS QQQ	< 0.004 mg/Kg	[216]
16 plaguicidas	QuEChERS GC-MS - LC-MS/MS	N/A	[217]
Multi-residue of 53 multi-class pesticides	LLE LC–MS/MS	0.0005–0.01 mg/Kg	[218]
Dimethoate, diazinon, pyrimiphos, malathion, fenthion, chlorpyrifos, methidathion y azinfos-methyl	GC–FDP GC–QqQ–MS/MS Extracción por microondas LLE – SPE	0.007–0.02 mg/Kg	[219]
Chlortoluron, diuron, atrazine, simazine, terbutylazine-desethyl, dimetoathe, malathion y parathion	SPE Gas chromatography–mass spectrometry	1.5 - 3.0 µg/L	[220]
<i>Analito</i>	<i>Tratamiento de muestra / Técnica de determinación</i>	<i>Concentración Rango LOD</i>	<i>Ref.</i>

35 plaguicidas	LLE, GC-NPD, GC-ECD	0.4-14.5 µg/Kg	[189]
32 plaguicidas	GC-MS/MS (ion-trap analyzer) GC-ECD, GC-NPD	0.2–10 µg/Kg	[133]
Plaguicidas y PAHs	GPC - GC-MS/MS	0.05-1.7 µg/Kg	[221]
225 Plaguicidas	GC-QqQ-MS GPC	0.01-10 µg/Kg	[222]
Procymidone	HRGC-MS	0.08 - 0.24 mg/Kg	[223]
105 plaguicidas	QuEChERS modificado, MSPD HPLC – MS/ TOF	0.05-10 µg/Kg	[224]
7 organoclorados y 17 congéneres de bifenilos policlorados (PCBs)	GC- HRGC/ECD	Organoclorados: 3.7 ng/Kg, PCBs: 1.8 ng/Kg	[225]
7 plaguicidas	LC-QTOF-MS	1.5 - 5 mg/Kg	[226]

Ref. Referencia bibliográfica; ECD: detector captura de electrón; EI: impacto electrónico; ESI: ionización electrospray; FID: Detector de ionización de llama; GC: cromatografía de gases; GC-MS: cromatografía de gases – espectrometría de masas; GC-MS/MS: cromatografía de masas-espectrometría de masas –tándem; GPC: cromatografía de permeación en gel; HRGC: cromatografía de gases de alta resolución; HS-SPME: microextracción en fase sólida con espacio de cabeza; HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia; LC: cromatografía de líquidos; LC-ESI-MS/MS: cromatografía de líquidos espectrometría de masas – tándem, con ionización electrospray; LC-GC:cromatografía de líquidos – cromatografía de gases; LC-MS: cromatografía de líquidos espectrometría de masas; LC/MS/MS: cromatografía de líquidos – espectrometría de masas – tándem; LC-TOFMS: cromatografía de líquidos – espectrometría de masas con tiempo de vuelo; MSPD: dispersión de la muestra en fase sólida; NPD: detector nitrógeno – fósforo; PCBs: congéneres de bifenilos policlorados; Q: cuadrupolo (analizador de masas); QQQ: analizador triple cuadrupolo; QTRAP: analizador triple cuadrupolo con trampa lineal; QuEChERS: “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”; RPLC: cromatografía líquida de fase reversa; SFE: extracción por fluidos supercríticos; SIM: selected ion monitoring; SPE: Extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; TOF: analizador tiempo de vuelo; UPLC: cromatografía líquida ultra-performance.

La mayoría de los métodos de extracción descritos están basados en la aplicación de dos técnicas: GPC y SPE. Con ambas se puede realizar o no una etapa preliminar de partición líquido-líquido [227].

La GPC emplea unas columnas rellenas de un polímero poroso, en forma de microesferas, que forman un lecho cromatográfico que separa los compuestos en base a su peso molecular, lo que permite separar la fracción de plaguicidas de la fracción grasa. La principal ventaja es la rapidez, pero tiene el gran inconveniente de que es difícil llegar a unas condiciones óptimas que permitan separar eficazmente los plaguicidas de la matriz ya que, en la mayoría de los casos, ambas fracciones se encuentran parcialmente superpuestas [197].

La SPE se lleva a cabo normalmente en una columna rellena de un material adsorbente (florisil, aminopropil, gel de sílice, etc.). La muestra se hace pasar por la columna donde los plaguicidas se separan de la materia grasa. En función de la naturaleza y polaridad del polímero, la fuerza con la que se retienen es diferente, lo que provoca que se produzca la elución a diferentes tiempos [209].

Además de estas dos técnicas, recientemente se están utilizando otras técnicas, relacionadas con la SPE, como SPME [212] y la dispersión de la muestra en fase sólida (MSPD, *Matrix solid phase dispersión*) [139].

El aceite de oliva es más complejo de analizar que otros aceites vegetales como la soja, girasol y germen de trigo, esto se debe en parte, a la presencia relativamente elevada de lípidos que eluyen en la etapa de limpieza, y a los componentes potencialmente interferentes (por ejemplo los pigmentos) que coeluyen cuando se realiza la determinación cromatográfica [119]. Así pues, se requieren diferentes tratamientos con el fin de eliminar las interferencias de la matriz [228]. Además, son bien conocidos los problemas analíticos asociados con la determinación de plaguicidas en matrices grasas, ya que incluso pequeñas cantidades de lípidos pueden causar daños en columnas y detectores, haciendo imposible la confirmación inequívoca de la identidad del analito.

El método preferido para la determinación de plaguicidas volátiles en aceites es la GC, debido a su elevada eficiencia de separación y a la variedad de métodos de detección disponibles. Entre ellos destacan el detector de nitrógeno-fosforo (NPD) denominado también detección termoiónica específica (TSD) para compuestos que contienen N o P [213], y el detector de fotometría de llama (FPD) [219] más apropiado para compuestos que contienen P.

Alternativamente, para alcanzar altos niveles de selectividad y bajos los límites de detección en extractos secos, puede utilizarse MS en tándem (MS/MS), con trampa de iones (220) o triple cuadrupolo [219, 222].

Gilbert-López y col., [124] realizaron una revisión de las distintas metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva y aceituna, en la que se observaron diferentes técnicas de limpieza, especialmente los aplicados al aceite de oliva. Algunos se basan en extracción líquido-líquido [189, 215], cromatografía de permeación en gel (GPC) [213, 214, 221], extracción en fase sólida [213, 220] con diferentes adsorbentes-florisil [215], alúmina neutra o C18 [229], micro-extracción en fase sólida (SPME) [214], dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) [124, 213, 214], extracción con microondas [219] o extracción con fluidos supercríticos (SFE) [124].

3.3. Degradación de plaguicidas

La degradación del plaguicidas dará lugar a nuevos compuestos que no necesariamente han de ser menos tóxicos que la sustancia original; así cuando el producto de degradación resulta menos tóxico que la sustancia original se trata de una inactivación o detoxificación, si por el contrario, el producto de degradación resulta con mayor toxicidad que el original, se trata de una activación.

La degradación puede ser parcial o total, llegando en casos extremos a la obtención de compuestos inorgánicos como H₂O, CO₂, haluros, amonio, fosfatos, etc.

3.3.1. Tipos de reacción y cinética de degradación de plaguicidas

Las reacciones de degradación son muy variadas (oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución, eliminación de grupos funcionales, etc.) pudiendo estar afectadas tanto por agentes orgánicos (principalmente bacterias del suelo), como inorgánicos. No obstante en la degradación de un plaguicida en el campo, al producirse varios de estos fenómenos de forma simultánea y existir interacciones entre los diversos agentes degradantes, la cinética aparente de degradación del plaguicida puede ser muy diferente

a la obtenida en ensayos de laboratorio, bajo condiciones rigurosamente controladas y donde normalmente se estudia un único proceso.

La cinética de degradación de los plaguicidas se ve afectada por:

1. Cantidad de plaguicida y accesibilidad a éste del sistema que lo va a degradar. Por ejemplo, el plaguicida puede estar absorbido y no ser accesible a los microorganismos del suelo o por el contrario puede estar como emulsión en agua muy fácilmente accesible.
2. Presencia de microorganismos o sistemas enzimáticos capaces de degradar los plaguicidas
3. Nivel de actividad de los microorganismos; éste a su vez está afectado por condiciones ambientales tales como pH, humedad, aireación, etc.
4. Condiciones físico-químicas del medio, potencial redox, temperatura, pH, etc.

Muchos modelos para estimar el comportamiento del plaguicida en el medio ambiente suponen que su degradación se puede expresar como una reacción de primer orden, (Ecuación 3.3.), con respecto a la concentración del plaguicida.

$$dc / dt = -KC \quad (\text{Ecuación 3.3.})$$

C = concentración
 K = constante de reacción
 t = tiempo

Las expresiones de los niveles de biodegradación deben tener en cuenta tanto la concentración de plaguicida en el sustrato como la actividad de los microorganismos o sistemas enzimáticos presentes (la ecuación de Monod o la de Michaelis - Menten). En trabajos realizados [230], se ha señalado la necesidad de tener una aproximación multifásica para expresar la cinética de la degradación de los plaguicidas, dependiendo de la concentración de los productos químicos en el medio. Algunos estudios de laboratorio muestran que la cinética de la degradación calculada a partir de las

reacciones normalmente utilizadas en tales estudios, no se puede aplicar cuando la concentración de plaguicidas es extremadamente baja o muy alta.

El tiempo necesario para que se descomponga la mitad del plaguicida en una reacción de primer orden, tiene un valor constante e independiente de la concentración, este tiempo se llama semiperiodo, y viene dado por la Ecuación 3.4 [231].

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K} \quad (\text{Ecuación 3.4.})$$

Siendo K la constante de velocidad de primer orden

La facilidad de degradación de un plaguicida depende de su estructura molecular. En general, los más resistentes son los organoclorados y entre éstos los fenol-bencenos altamente sustituidos. Entre los menos resistentes están los organofosforados.

Los procesos de degradación están influidos por distintos factores como la temperatura, la intensidad y duración de la luz solar, el pH o la composición química del plaguicida. En principio, y bajo condiciones favorables, la degradación tiene lugar hasta la mineralización completa del plaguicida, dando como productos finales CO_2 , H_2O , NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , etc., dependiendo de cada plaguicida en general. Pero en muchas ocasiones, esta transformación total no ocurre, y el plaguicida es degradado a otros productos cuya toxicidad, movilidad y efectos sobre el medio son prácticamente desconocidos, aunque en muchos casos se trata de compuestos más tóxicos y persistentes que los productos de partida.

Los procesos más importantes para la degradación de plaguicidas [232] son los siguientes:

- *Hidrólisis.*

Este proceso viene determinado por la reacción de una sustancia con el agua con ruptura de enlaces y depende estrechamente del pH.

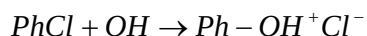
- *Deshalogenación*

Esta forma de degradación es común en plaguicidas organoclorados y es por ejemplo una de las etapas de degradación del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). En general el proceso es el siguiente:



- *Hidroxilación*

Corresponde al ataque del grupo OH⁻, principalmente sobre los grupos aromáticos. Es un proceso frecuente en plaguicidas organoclorados.



- *Condensación*

Este proceso tiene lugar entre compuestos diferentes y en particular entre un compuesto amínico y otro ácido.



- *Oxidación*

Ocurre en los organofosforados al pasar el enlace P=S a P=O. También se pueden formar epóxidos a partir de compuestos con doble enlace.

- *Reducción*

Los procesos de reducción consisten en la conversión del grupo (-NO₂) a amino (-NH₂).

- *Fotodescomposición*

Esta modificación química de los plaguicidas viene producida por la interacción de la radiación solar ultravioleta y visible (240 – 700 nm) con grupos funcionales y sus enlaces, y afecta especialmente a los grupos -OH, -SH, C=O, -Cl, -N=, así como a dobles enlaces, sobre todo si están conjugados. La fotodescomposición también puede tener lugar a través de sustancias fotorreceptoras (clorofilas, carotenos y sobre todo compuestos húmicos), capaces de captar energía lumínica y de traspasarla a los plaguicidas. Los compuestos orgánicos neutros y moléculas apolares, pueden

interaccionar con partículas minerales a través de débiles interacciones físicas, para ello, la molécula debe tener un tamaño grande.

3.3.2. Comportamiento medioambiental de los plaguicidas

Algunos plaguicidas pueden ser retenidos o asimilados por los vertebrados, invertebrados y microorganismos que habitan en el suelo. Una vez finalizado el ciclo vital de estos organismos, los plaguicidas y sus metabolitos volverán al suelo donde serán finalmente degradados. El plaguicida que queda así incorporado al suelo, entra en un ecosistema dinámico e inmediatamente empieza a degradarse «*in situ*», a moverse del sistema inicial a otros sistemas, o a mantenerse en él con su estructura original o más o menos transformado, durante un periodo de tiempo variable.

Su desaparición del suelo transcurre de acuerdo a una cinética de primer orden, tal y como puede apreciarse en la Figura 3.9.

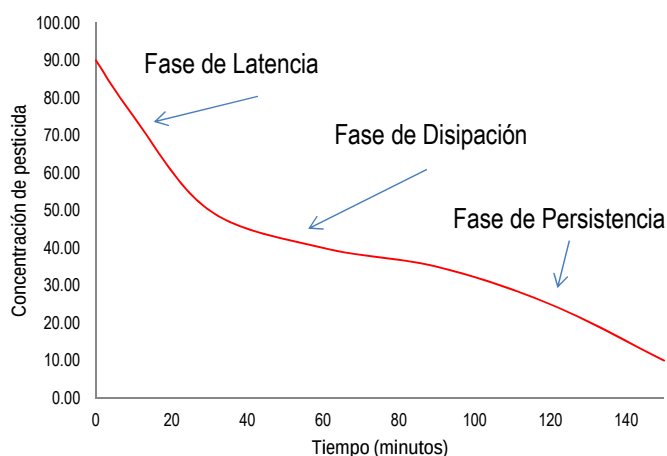


Figura 3.9. Cinética de la degradación de los plaguicidas.

Se pueden diferenciar tres fases: Una primera que puede denominarse de «latencia», de duración corta y en la que el plaguicida mantiene constante una determinada concentración; una segunda, relativamente rápida en lo que respecta a su desaparición llamada de «disipación»; y finalmente, la tercera más lenta, conocida como de «persistencia». Esta última, es la responsable de lo que se conoce como «persistencia del plaguicida», y se expresa en unidades de tiempo. Dependiendo de su extensión se hablará de horas, días, meses e incluso años [233].

El término más corrientemente utilizado para expresar la persistencia es el denominado «tiempo de vida media $t_{1/2}$ », que se define como, *el tiempo necesario para la disipación de la mitad de la cantidad inicialmente presente*. En determinados casos, algunos autores consideran más correcta la utilización del término «tiempo de desaparición» expresado como TD_{50} , TD_{75} y/o TD_{90} , que indican respectivamente el tiempo necesario para la desaparición del 50, 75 o 90% de la concentración inicial del plaguicida aportado o presente en el suelo [234].

Los principales factores que influyen en el comportamiento medioambiental de los plaguicidas [120] son los siguientes:

- Propiedades físico-químicas de los plaguicidas, como: coeficiente de adsorción, solubilidad en agua, coeficiente de reparto en octanol:agua, constante de ionización, estabilidad, volatilidad.
- Tipo de aplicación, como la formulación, método de aplicación, dosis, frecuencia.
- Características del suelo, como textura, composición química, propiedades físico-químicas, actividad biológica, orografía.
- Prácticas agrícolas y las condiciones medioambientales, como el laboreo, riego, drenaje, cubierta vegetal, lluvia, temperatura, viento.

Como consecuencia de los factores antes mencionados, la persistencia de un plaguicida en el medio, depende de una serie de procesos [120]:

- Degradación:
 - o Química, como por ejemplo: hidrólisis.
 - o Biológica, degradación por microorganismos del suelo.
 - o Fotolítica o fotodegradación, a través de radiación UV.
- Transporte:
 - o Volatilización, teniendo el riesgo de contaminar áreas distantes a la zona de aplicación de los plaguicidas.
 - o Escorrentía, riesgo de contaminación de aguas superficiales.
 - o Lixiviación, riesgo de contaminación de aguas subterráneas.
- Adsorción:
En el suelo, a partir de los compuestos orgánicos y minerales del suelo.
- Absorción:
Por la planta, es la principal fuente de bioacumulación en la cadena alimentaria y una ruta importante de exposición a los animales y humanos.

En la Figura 3.10, podemos observar los procesos que afectan a los plaguicidas en el medio ambiente.

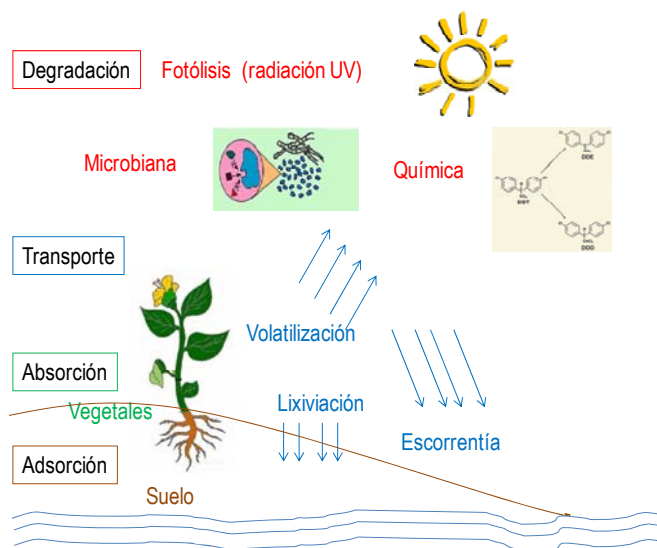


Figura 3.10. Esquema de los principales procesos que afectan a los plaguicidas en el medio ambiente.

3.4. Degradación de plaguicidas en aceite de oliva

Se han realizado estudios científicos en referencia al aceite de oliva sobre la salud en los humanos, en la que el aceite de oliva ofrece beneficios saludables. Sin embargo el aceite de oliva por su proceso de elaboración, es uno de los aceites que presenta alta contaminación por plaguicidas, por los agentes químicos utilizados en la prevención y/o tratamiento de plagas, hierbas, enfermedades, con el fin de garantizar la cosecha, afectan al olivar y a las aceitunas, que posteriormente son molturadas y extraído el aceite de oliva virgen.

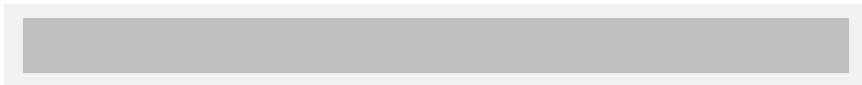
En los últimos años y debido al creciente interés por la contaminación de alimentos y en especial del aceite de oliva, con el objetivo de tratar problemas que se originan por posibles contaminaciones, Martínez y col. [235], han investigado una metodología para degradar los plaguicidas, mediante la aplicación la luz UV al aceite de oliva virgen, en la que se diseñaron una serie de experimentos a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30°C) y tiempos de operación, para determinar la influencia de la temperatura – tiempo de exposición UV en la degradación de los plaguicidas así como en los parámetros de calidad del aceite de oliva. Ha sido el único estudio científico encontrado en las referencias bibliográficas para la eliminación de los contaminantes del aceite de oliva, observándose rendimientos de la fotodegradación de los plaguicidas en el rango de 7 - 80%, con la consiguiente reducción del contenido de plaguicidas en el aceite de oliva virgen y la estabilidad de los parámetros de calidad.

Con tal fin, se trata de estudiar en esta tesis Doctoral una metodología para la eliminación de plaguicidas, mediante la fotólisis por radiación UV, tratando de no alterar las características saludables del aceite de oliva.

En investigaciones realizadas por el Instituto de la Grasa [236], se han propuesto otras técnicas para la degradación de los plaguicidas en el aceite de oliva como la refinación física del aceite de oliva en la que investigaron la degradación de cuatro tipos de plaguicidas, el endosulfan (α -endosulfan, β -endosulfan y endosulfan-sulfato), simazine, oxifluorfen y diflufenican; en el que el blanqueo sólo resultó eficaz para la eliminación de la simazine. La eliminación de los otros plaguicidas en la etapa de desodorización se dio en diferentes períodos (1h para diflufenican, oxifluorfen y α -endosulfan, 2 h para el β -endosulfan y 3 h para el endosulfan-sulfato).

Otras investigaciones [237, 238] en aceites, proponen también la refinación como una poderosa tecnología para la degradación de contaminantes orgánicos entre ellos los plaguicidas, mediante el uso de esta técnica se garantiza la calidad de los aceites y grasas refinadas, en el que se tiene cuidado con las características organolépticas y nutricionales, así como la estabilidad de la grasa. Fukazawa y col. [238], añadieron al aceite de soja, plaguicidas de la familia de los carbamatos, luego realizaron los procesos de refinado de aceite, en el que el contenido de plaguicidas fue determinado inmediatamente después de refinado y se obtuvieron resultados de degradación de los plaguicidas hasta del 70 - 80%.

4. INSTRUMENTACIÓN



4. INSTRUMENTACIÓN

En este capítulo se incluye la instrumentación empleada para la realización de los distintos trabajos de investigación, especificando los equipos y reactores utilizados.

4.1. HPLC-TOFMS

El sistema de HPLC, utilizado fue un Agilent Series 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), compuesto por una bomba binaria, un mezclador, un desgasificador y un muestreador automático que es capaz de tomar volúmenes comprendidos entre 0.1 – 100 μ L con gran precisión. El muestreador automático tiene capacidad para 100 viales de 2 mL.

Es una técnica de separación para la mezcla de compuestos que se distribuye entre dos fases (una fase móvil y una estacionaria), teniendo lugar la separación en función de la distintas afinidades que presente cada compuesto de la mezcla por las diferentes fases. La fase estacionaria es un sólido poroso que generalmente es de forma particulada, o bien una fina capa de sustancia líquida ligada a un soporte sólido, contenido en el interior de un tubo habitualmente metálico que da lugar a la columna cromatográfica, auténtico “corazón” del cromatógrafo de líquidos. La fase móvil es un líquido, ya sea un disolvente o una mezcla de disolventes, a veces con un pH modificado mediante la adición de ácidos, bases o sistemas tampón.

El HPLC estaba conectado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent 6220. La calibración del equipo para llevar a cabo medidas de masa exacta se realizó mediante un sistema automático y continuo que utiliza una fuente ESI dual, de modo que se introduce simultánea y ortogonalmente al efluente del HPLC y una disolución calibrante (disolución calibrante A, Agilent Technologies). La disolución calibrante contiene una mezcla de concentración conocida de dos sustancias cuyas masas se utilizan como referencia interna: purina ($C_5H_4N_4$, de m/z 121.0508739) y HP-921

[hexakis-(1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoropentoxo)- phosphazene] ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$, de m/z 922.009798). El software del instrumento registra continuamente los valores de las masas internas de referencia y se autocalibra al mismo tiempo que registra los resultados de la muestra. El instrumento usado proporciona una resolución típica de 9700 ± 500 a media altura de pico (FWHM) a un valor de m/z 922. La velocidad de barrido era superior a 20 scans por segundo. En la Figura 4.1. se muestra una fotografía del instrumento utilizado.

Para el control del HPLC-TOFMS, adquisición de datos y procesamiento de los resultados se utilizó el programa Analyst (para Agilent TOF) de Applied Biosystem / MDS SCIEX (Frankfurt, Alemania).



Figura 4.1. Equipo de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo empleado en el estudio.

4.2. GC-MS/MS

La determinación se realizó con un cromatógrafo de gases (Varian Inc. CP-3800 Walnut Creek, California, EE.UU.) equipado con control electrónico de flujo (EFC), un inyector 1079 capilar universal y CombiPAL automuestreador (CTC Analytics) con capacidad para 98 viales de 2 ml y 32 viales 10 o 20 mL para análisis mediante las técnicas de HS o SPME, compuesto por un horno para el calentamiento de los viales en los experimentos de HS, SPME y HS-SPME, y un brazo robótico donde se emplaza la jeringa intercambiable (según se trabaje en inyección líquida, espacio de cabeza o SPME).

El Cromatógrafo de gases fue conectado con un espectrómetro de masas modelo 300-MS triple cuadrupolo (Varian Inc. Walnut Creek, California, EE.UU.), que opera en modo de ionización electrónica (EI, 70 eV). El espectrómetro de masas se calibró según sea necesario con perfluorotributilamina (PFTBA). Para los experimentos de MS / MS, el Ar fue utilizado como gas de colisión y la presión de cámara de colisión se fijó en 1,80 mTorr.

Para el control del GC-MS, adquisición de datos y procesamiento de resultados se utilizó el programa de Varian MS WorkStation (versión 6.9). En la Figura 4.2. se puede ver una fotografía del instrumento utilizado.



Figura 4.2. Equipo de cromatografía de gases/espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo empleado en el estudio.

4.3. Equipo para radiación ultravioleta

Los experimentos se realizaron en un fotoreactor compuesto por un tanque reactor de 1 L de capacidad, con una lámpara UV inmersa en un tubo de cuarzo y una camisa de enfriamiento, un agitador magnético dentro del reactor para mezclar la disolución de plaguicida y agua Mili-Q. Se colocó un termómetro en el interior del reactor para indicar la temperatura de la disolución durante la exposición UV. Se puede observar el equipo empleado en la Figura 4.3.

La lámpara UV tiene las siguientes características:

- Lámpara UV de inmersión (modelo CA 150; n 5600 1725; marca HNG Alemania G4) presión media de Hg
- Longitud total de 384 mm de inmersión
- Centro de inmersión de longitud de rayos de 303 mm
- Posición del centro de emisión de la lámpara de 44 mm
- Potencia de la lámpara 150 W

- Nivel nominal de intensidad de emisión 200-600 nm.



Figura 4.3. Montaje del equipo empleado para llevar a cabo los estudios de degradación UV.

4.4. Otros equipos utilizados

La extracción de la fase sólida se llevó a cabo en un dispositivo de vacío para SPE: Supelco Visiprep®, de Supelco (Bellefonte, CA, EEUU). El dispositivo se muestra en la Figura 4.4.



Figura 4.4. Dispositivo de vacío utilizado para la extracción en fase sólida (Supelco Visiprep®).

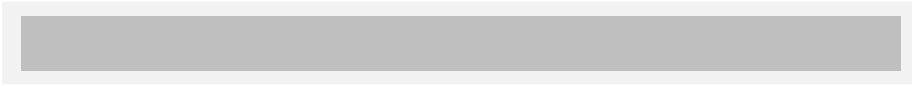
La evaporación de los extractos se realizó bajo corriente de nitrógeno, bien de forma manual utilizando un adaptador para tubos de ensayo con 6 salidas, o bien utilizando un

evaporador-condensador Turbovap LV (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA, EEUU) con capacidad para 48 tubos de ensayo, que permitía monitorizar y controlar la presión de N_2 y la temperatura del baño de agua. El evaporador se muestra en la Figura 4.5.



Figura 4.5. Evaporador-concentrador Turbovap LV.

5. *R*ESULTADOS Y DISCUSIONES



- 5.1. Monitoreo de los residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos en aceite de oliva virgen de diferentes zonas de producción mundial

Resumen

En este estudio se ha pretendido obtener una visión global de los plaguicidas que más se usan y se detectan en las distintas regiones de producción de aceite de oliva virgen a nivel mundial, con la idea de seleccionar las especies más relevantes para estudiar su degradación mediante tratamiento UV. Para ello, se ha llevado a cabo la recolección de diferentes muestras de aceite de oliva, incluyendo un total de 56 muestras de 10 países, en las que se investigaron más de 500 contaminantes orgánicos, incluyendo alrededor de 450 plaguicidas de distintas familias como insecticidas, herbicidas y fungicidas junto con otros contaminantes orgánicos relevantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Para la evaluación de los plaguicidas se hizo uso de dos métodos multi-residuo: (i) cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) empleando como fuente de ionización electrospray y; (ii) cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo. La metodología utilizada para la extracción de los plaguicidas se basó en la extracción líquido-líquido con acetonitrilo seguida de una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva, con amina primaria-secundaria (PSA) y C₁₈. La identificación y confirmación de los compuestos se basó en tiempo de retención y mediciones de masa exacta de las moléculas protonadas ([M+H]⁺) y sus fragmentos principales. Los límites de detección (LODs) obtenidos eran inferiores a 1 µg/Kg para LC-TOFMS y 5 µg/Kg para el GC-MS/MS. Además de los dos métodos multi-residuo de LC-TOFMS desarrollados, también se hizo uso de un método de *screening* de contaminantes orgánicos empleando una base de datos de masas exacta de iones que incluía más de 500 contaminantes. Los métodos propuestos se aplicaron al estudio de las 56 muestras de aceite de oliva de diferentes países productores obtenidos en las campañas de cosecha de 2008 al 2011, 5 países europeos (España, Francia, Grecia, Italia y Portugal), 3 países de América del Sur (Argentina, Chile y Perú), 1 país africano

(Marruecos) y 1 país asiático (Siria). Alrededor del 71.43% de las muestras estudiadas contenían residuos de plaguicidas. Los plaguicidas que se detectaron con mayor frecuencia fueron buprofezin, chlorotuloron, chlorpyrifos ethyl, difenoconazole, dimethametryn, diuron, pirimiphos methyl y terbutylazine, cuyo rango de concentración detectado fueron de 0.001 – 0.209 mg/Kg.

Se observaron que 6 de las muestras sobrepasan los límites establecidos para contaminantes orgánicos, 3 de ellas procedentes de Chile superan el chlorpyrifos ethyl y 3 muestras procedentes de España el contenido de terbutylazine.

5.1.1. Introducción

El aceite de oliva es obtenido del fruto del olivo (*Olea Europaea*), exclusivamente por medios mecánicos, bajo unas condiciones térmicas que no alteren su calidad. La industria asociada a la producción del mismo es esencial en el desarrollo y la economía de las regiones productoras. Durante varias etapas del proceso de cultivo y producción, y con el fin de evitar posibles pérdidas en la cosecha por insectos y plagas, se aplican plaguicidas en el olivar. Los plaguicidas más frecuentemente empleados en las plantaciones de olivares son principalmente insecticidas, herbicidas y fungicidas. Los residuos de estos plaguicidas pueden persistir hasta la cosecha, por lo que pueden contaminar las aceitunas utilizadas para producir el aceite de oliva virgen. Esto puede causar la presencia de pequeñas cantidades de estos plaguicidas en muestras de aceite de oliva [213].

Los plaguicidas se incorporan a la aceituna debido a los tratamientos con productos fitosanitarios, aunque los niveles de concentración de los mismos pueden incrementarse como consecuencia de prácticas agrícolas inadecuadas (tratamientos demasiados tardíos de plagas) o bien por contacto directo de las aceitunas con restos de herbicidas presentes en el suelo [210]. Esto es común cuando se emplean prácticas de recolección que implican la recogida de la aceituna del suelo mediante sopladoras, tras ser derribada del árbol. En un estudio reciente, se indica que la contaminación ambiental también puede ser causante de la presencia de residuos de plaguicidas (endosulfán) en partidas de aceite de oliva, ya que se detectan residuos de endosulfán, aunque en las fincas de origen no se aplicó el producto [239]. Se trataba de un fenómeno de contaminación ambiental, en el que existía un foco emisor contaminante de endosulfán localizado en los tratamientos que se aplican a los cultivos de algodón y su posterior transporte medioambiental. Es evidente, que por las causas anteriormente comentadas, el aceite de oliva virgen puede contener determinadas cantidades de residuos de plaguicidas.

El control del uso adecuado de productos fitosanitarios es un aspecto muy importante en el sector del aceite de oliva. Ya sea producción integrada o ecológica, es necesario que existan metodologías para el control de residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos. Actualmente el escenario de países productores de aceite de oliva se ha extendido a otros países como China, EE.UU., Australia, países norteafricanos, Chile, Argentina, etc. Además las prácticas agrícolas difieren de unos sitios a otros, empleándose distintos productos fitosanitarios en cada caso. Por este motivo, la presencia de residuos de plaguicidas debe ser controlada regularmente para asegurar la protección del consumidor [117]. Es por ello, que existen distintas reglamentaciones de la Unión Europea, la Comisión del Codex Alimentarius, de la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) y de la OMS [115, 116], que establecen límites máximos de residuos (LMRs) en aceitunas y aceite de oliva. No obstante, las normativas existentes no están armonizadas entre los distintos países.

La técnica más comúnmente empleada actualmente para el análisis de residuos de plaguicidas en aceite de oliva es la cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) [124, 227]. La espectrometría de masas ha desplazado a otros sistemas de detección empleados anteriormente (NPD [240], ECD [209]., etc) que no proporcionan unos niveles de confirmación adecuados a las exigencias actuales impuestas por las normativas establecidas a tal efecto [241, 242]. El uso de GC-MS es especialmente apropiado para el análisis de compuestos volátiles y poco polares. La especificidad del detector de masas permite que se puedan detectar residuos de plaguicidas en muestras como aceite de oliva y aceituna consiguiendo unos resultados más que aceptables en cuanto a límites de detección y nivel de confianza de confirmación. Sin embargo, el número de plaguicidas que se usan en la actualidad es cada vez mayor y los nuevos plaguicidas que se están empleando son cada vez más polares. Esta polaridad y la presencia de una serie de grupos químicos polares hacen que su análisis por cromatografía de gases (GC-MS) no sea realmente satisfactorio. Éste es el caso de un

gran número de herbicidas. En estos casos, se requiere el análisis por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS) [213, 243].

Por otra parte, el desarrollo de técnicas analíticas capaces de extraer plaguicidas en muestras de alto contenido graso como aceite de oliva o aceituna es relativamente escaso [124, 126, 227, 244]. Además, hay que considerar que el desarrollo de protocolos de extracción es muy complejo, dada la gran variedad de plaguicidas y clases con propiedades físicas tan diferentes que podemos encontrar. Considerando el proceso analítico en aceites de forma global (muestreo, tratamiento de muestra, análisis, resultados) es evidente la singularidad del tratamiento de muestra aplicado, dadas las características de altos contenidos en grasa de esta matriz [245]. El problema principal de esta matriz es que una limpieza no exhaustiva del extracto final conlleva la presencia de pequeñas cantidades de grasa que pueden dañar los equipos (columnas, detector, etc) [124].

En este estudio se ha pretendido obtener una visión global de los plaguicidas que se usan y se detectan en las distintas regiones de producción de aceite de oliva virgen a nivel mundial, con la idea de seleccionar las especies más relevantes para estudiar su degradación mediante tratamiento UV. Se ha llevado a cabo la recolección de diferentes muestras de aceite de oliva, incluyendo un total de 56 muestras de 10 países. Para la evaluación de los plaguicidas se han desarrollado dos métodos multi-residuo: (i) cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) empleando como fuente de ionización electrospray y; (ii) cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo. La metodología utilizada para la extracción de los plaguicidas se basó en la extracción líquido-líquido con acetonitrilo seguida de una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva, amina primaria-secundaria (PSA) y C₁₈ [124, 217, 224, 246]. Además de los dos métodos multi-residuo de LC-TOFMS y GC-MS/MS desarrollados, también se hizo uso de un método de *screening* de contaminantes

orgánicos en base de datos de masas exactas de iones que incluía más de 500 contaminantes [247].

5.1.2. Experimental

5.1.2.1. Muestras analizadas

Se estudiaron 56 muestras de aceite de oliva de distintas variedades, procedentes de diferentes regiones de producción mundial. Los periodos de cosecha de las muestras eran desde la campaña del 2008 al 2011, que se obtuvieron de 10 países productores (España, Francia, Grecia, Italia y Portugal), 3 países de América del Sur (Argentina, Chile y Perú), 1 país africano (Marruecos) y 1 país asiático (Siria).

Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C antes de los análisis en botellas de color ámbar. En la Tabla 5.1.1., se muestra, el país de procedencia, la codificación, la variedad de aceituna, la marca, la zona de recolección de aceituna y el año de elaboración de las muestras de aceite virgen extra estudiadas.

Tabla 5.1.1. País de procedencia, codificación, variedad de aceituna, marca, zona de recolección y año de elaboración de las muestras de aceite de oliva virgen.

	Procedencia	Código	Variedad de aceituna	Marca	Zona de recolección	Año de elaboración
1	Argentina	A-1	N.D.	LAUR	Maipu, Mendoza	2011
2	Argentina	A-2	N.D.	La Joya	Guaymallen, Mendoza	2011
3	Argentina	A-3	N.D.	NUCETE	Aimogasta, La Rioja	2011
4	Argentina	A-4	N.D.	La Toscana	La Rioja	2011
5	Argentina	A-5	N.D.	Indalo	Pomán, Catamarca	2011
6	Chile	CH-1	N.D.	N.D.	Copiapó	2011
7	Chile	CH-2	N.D.	N.D.	Copiapó	2011
8	Chile	CH-3	N.D.	N.D.	Copiapó	2011
9	Chile	CH-4	N.D.	N.D.	Vallenar	2011
10	Chile	CH-5	N.D.	N.D.	Vallenar	2011
11	Chile	CH-6	N.D.	N.D.	Vallenar	2011
12	España	E-1	N.D.	Padilla 1808	Bailen	2009-2010
13	España	E-2	Picual	Padilla 1808	Bailen	2009-2010
14	España	E-3	Picual, Arbequina	Padilla 1808	Bailen	2010-2011
15	España	E-4	Picual	Manuel Montes Marín	Córdoba	2010-2011
16	España	E-5	Picual	SAT El Labrador	Málaga	2010-2011
17	Francia	F-1	N.D.	PUGET	Provenza	2010-2011
18	Grecia	G-1	N.D.	ATHENA	Creta	2010-2011
19	Italia	I-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	Marruecos	M-1	N.D.	Mabrouka	Settat	2010-2011
21	Marruecos	M-2	N.D.	OUED SOUSS	Belvedere – Casablanca	2010-2011
22	Marruecos	M-3	N.D.	El Ouazzania	Uezán	2010-2011
23	Marruecos	M-4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
24	Perú	P-1	Ascolana, Aceitera, Barnea, Empeltre	Montefiori	Tacna	2009
25	Perú	P-2	Ascolana, Aceitera, Sevillana, Empeltre, Moraiolo	Montefiori	Tacna	2009
26	Perú	P-3	Ascolana, Aceitera, Sevillana, Empeltre	Montefiori	Tacna	2009

	Procedencia	Código	Variedad de aceituna	Marca	Zona de recolección	Año de elaboración
27	Perú	P-4	Ascolana, Sevillana, Empeltre, Moraiolo	Montefiori	Tacna	2008
28	Perú	P-5	Frantoio	Montefiori	Tacna	2008
29	Perú	P-6	Frantoio	Montefiori	Tacna	2009
30	Perú	P-7	Coratina	Montefiori	Tacna	2009
31	Perú	P-8	Sevillana, Frantoio	Montefiori	Tacna	2009
32	Perú	P-9	Sevillana	Montefiori	Tacna	2009
33	Perú	P-10	Sevillana	Montefiori	Tacna	2009
34	Perú	P-11	Frantoio	Montefiori	Tacna	2009
35	Perú	P-12	Arbequina	Montefiori	Tacna	2009
36	Perú	P-13	Sevillana	Montefiori	Tacna	2008
37	Perú	P-14	Coratina, Frantoio, Sevillana	Montefiori	Tacna	2010
38	Perú	P-15	Sevillana	Montefiori	Tacna	2010
39	Perú	P-16	Frantoio	Montefiori	Tacna	2010
40	Perú	P-17	Coratina	Montefiori	Tacna	2010
41	Perú	P-18	Sevillana	San Sebastián	Tacna	2009
42	Perú	P-19	Sevillana	San Sebastián	Tacna	2009
43	Perú	P-20	Sevillana	Vallesur	Tacna	2011
44	Perú	P-21	Sevillana	OLIPERÚ	Tacna	2011
45	Perú	P-22	Frantoio	OLIPERÚ	Tacna	2011
46	Perú	P-23	Sevillana	Amancay	Tacna	2011
47	Perú	P-24	Sevillana	Amancay	Tacna	2011
48	Perú	P-25	Sevillana	Amancay	Tacna	2011
49	Perú	P-26	Sevillana	Marcahuasi	Tacna	2010
50	Perú	P-27	Coratina	Marcahuasi	Tacna	2011
51	Perú	P-28	Coratina	Montefiori	Tacna	2011
52	Perú	P-29	Sevillana	Montefiori	Tacna	2010
53	Perú	P-30	Sevillana	Montefiori	Tacna	2011
54	Perú	P-31	Frantoio	Montefiori	Tacna	2011
55	Portugal	PT-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
56	Siria	S-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: no especifica en el envase

5.1.2.2. Tratamiento de muestra: extracción líquido-líquido

Se trajo la técnica de QuEChERS modificado para matrices grasas [224], en una porción representativa de la muestra de 3 g fue pesada en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL de capacidad, junto con 7 mL de agua ultrapura. A continuación, se añaden 10 mL de acetonitrilo (MeCN) y el tubo se agita manualmente durante 1 minuto. Después se añaden 4 g de MgSO_4 y 1 g de NaCl. Inmediatamente después (para evitar la coagulación del sulfato de magnesio anhidro) el tubo se agita de nuevo enérgicamente durante 1 minuto y posteriormente la mezcla se centrifugó a 3700 revoluciones por minuto (rpm) durante otro minuto. Una vez separadas las fases, se toman 5 mL del sobrenadante (extracto de acetonitrilo) y se transfieren a un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL de capacidad, al que se habían añadido previamente 750 mg de MgSO_4 , 250 mg de PSA y 250 mg de C_{18} . El segundo tubo fue agitado durante 30 s y después se centrifugó a 3700 rpm durante 1 min. Un volumen de 3 mL de dicho extracto fue evaporado en un tubo de ensayo de vidrio, hasta casi sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.2 mL de metanol (MeOH) y 0.8 mL de agua ultrapura (milli Q) para la determinación mediante LC-TOFMS. De este modo se obtuvo un extracto que contenía el equivalente de 0.9 g de muestra por mililitro de extracto. Para la determinación mediante GC-MS, el extracto se reconstituyó en 0.5 mL de acetato de etilo y 1 mL de hexano, de modo que se obtuvo un extracto que contenía el equivalente de 0.6 g de muestra por mililitro de extracto. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y transferido a un vial para su análisis. En la Figura 5.1.1, se puede ver un esquema de este procedimiento. Para la determinación mediante GC-MS, los extractos se diluyeron 1:10 con hexano.

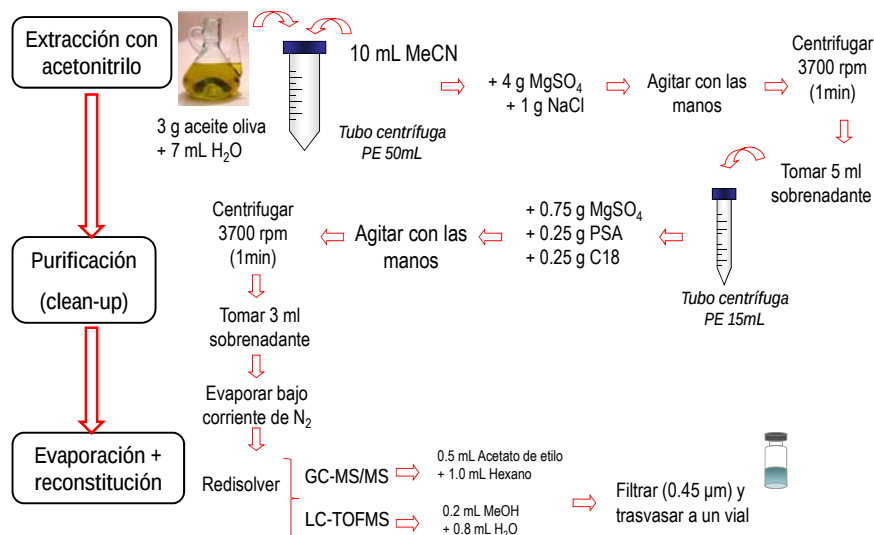


Figura 5.1.1. Esquema del protocolo QuEChERS utilizado para obtener los extractos de aceite.

5.1.2.3. Cromatografía de gases – espectrometría de masas

La determinación se realizó en un cromatógrafo de gases (Varian CP-3800), descrito en el apartado de instrumentación. La separación de los analitos se lleva a cabo utilizando una columna capilar Varian Factor Four VF-5-ms (30m x 0.25mm i.d. x 0.25 µm) y He como gas portador a un flujo de 1.0 mL/min. La rampa de temperatura utilizada comienza a 70°C durante 2 minutos, después sube hasta 180°C a una velocidad de 10°C/min y se mantiene a esta temperatura durante 5 minutos, a continuación sube hasta los 260°C a 6°C/min y por último se alcanzan 300°C a una velocidad de 4°C/min, para un tiempo total de análisis de 43 minutos.

El cromatógrafo de gases empleaba como detector un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Varian 300-MS). Las temperaturas de la línea de transferencia, fuente de iones y manifold seleccionadas fueron 280°, 250° y 40°C, respectivamente. Se establece un tiempo de retardo para el encendido del detector de 6.4 minutos para evitar daños en

la instrumentación. Se empleó el Ar como gas de colisión. El método fue desarrollado en modo de adquisición de monitorización de múltiples transiciones (MRM, *multiple reaction monitoring*). Para ello, se llevó a cabo una optimización previa de las condiciones de fragmentación para el correcto análisis de cada analito. Para el control del equipo, adquisición y evaluación de los datos se utilizó el software Varian MS Workstation (versión 6.9).

5.1.2.4. Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo

Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos, HPLC (Agilent Series 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), conectado con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent TOF 6220 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI) utilizada en modo de ionización positivo.

El método cromatográfico empleando consistió en un gradiente de elución de agua con 0.1% de ácido fórmico como disolvente A y acetonitrilo (de calidad LC-MS) como disolvente B. El método empezaba con un 10% de B, que se mantiene constante durante 1 min, seguido de un gradiente lineal hasta el 70% B a los 3 min, donde el incremento de acetonitrilo se hará más lento, hasta alcanzar el 100% B a los 8 min, donde se mantiene constante durante 2 minutos más. Se incluye al final una etapa de equilibrado de columna de 5 minutos después de cada análisis. Las condiciones cromatográficas ajustadas al equipo fueron las siguientes: columna analítica C₁₈ de 50 mm × 4.6 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈); el flujo de la fase móvil de 0.5 mL/ min; volumen de inyección de 2 µL. Condiciones del TOFMS, voltaje de capilar 4000V, gas de secado 9 L/min, temperatura del gas 325°C, presión del nebulizador 40 psi, voltaje del fragmentador 190 V, rango de m/z de 50 – 1000 Da. Para la adquisición y procesamiento de los resultados se utilizó el software Agilent MassHunter (versión B.04.00) y Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis (versión B.05.00).

5.1.2.5. Desarrollo de la base de datos

Para la realización de este capítulo, se ha seguido el esquema (Figura 5.1.2.), en la que se ha creado una base de datos de plaguicidas usados en el olivar, se ha realizado la confirmación e investigación de estos, mediante la base de datos de 416 contaminantes orgánicos [247] para LC (ver Tabla A1.) y de 48 contaminantes para GC-MS/MS [248].

En la Figura 5.1.2. se representa el flujo de trabajo empleado para el estudio de los plaguicidas en las muestras de aceite de oliva virgen.

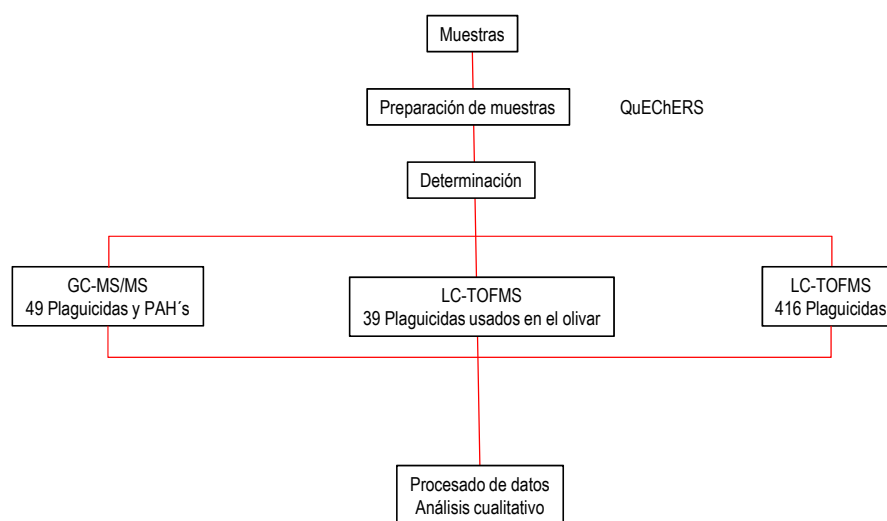


Figura 5.1.2. Esquema de la metodología aplicada a las muestras de aceite de oliva mediante los diferentes métodos.

Para el desarrollo de la base de datos se empleó un equipo de LC-TOFMS que permite la identificación de compuestos mediante la medida de las masas exactas de iones de forma inequívoca. Estas masas son universales e independientes del equipo/fabricantes utilizados, lo que permite crear bases de datos de pares tiempo de retención-masa

exacta de iones característicos (moléculas y fragmentos) para medir un número elevado de compuestos en un solo análisis de forma automática.

El primer paso para el desarrollo de la base de datos es obtener los valores experimentales de masa exacta y tiempo de retención de los analitos seleccionados. Para ello se analizan mezclas de los patrones en disolvente. Esta información se pasa a una hoja Excel (.csv) junto con el nombre del compuesto y su composición elemental (ver Figura 5.1.3.).

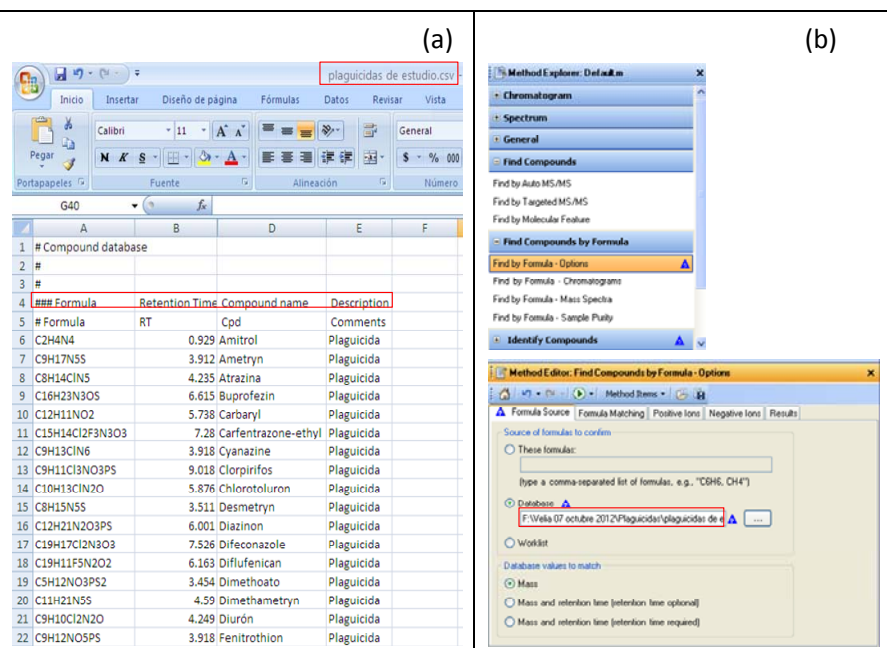


Figura 5.1.3. (a) Archivo Excel en formato (.csv) con la información necesaria para aplicar la base de datos, (b) Extracción de búsqueda de compuestos en el software.

Como se observa en la Figura 5.1.3., además de la masa del ion molecular se pueden introducir masas de fragmentos característicos y/o masas de aductos de sodio (muy comunes en el análisis de LC-TOFMS), como información adicional para la identificación de los analitos objetivo. Una vez introducidos todos los datos en el archivo, ya se puede

hacer la búsqueda de los contaminantes en muestras reales. Para ello, se utiliza el software *Agilent MassHunter Qualitative Analysis*, que presenta la opción de buscar compuestos por fórmula (*find compound by formula*), donde podemos cargar el archivo Excel previamente creado. Como se observa en la Figura 5.1.4., el resultado de aplicar la base de datos, es una lista con todos los compuestos identificados en las muestras, así como el cromatograma extraído y el espectro de masas de cada uno de ellos.

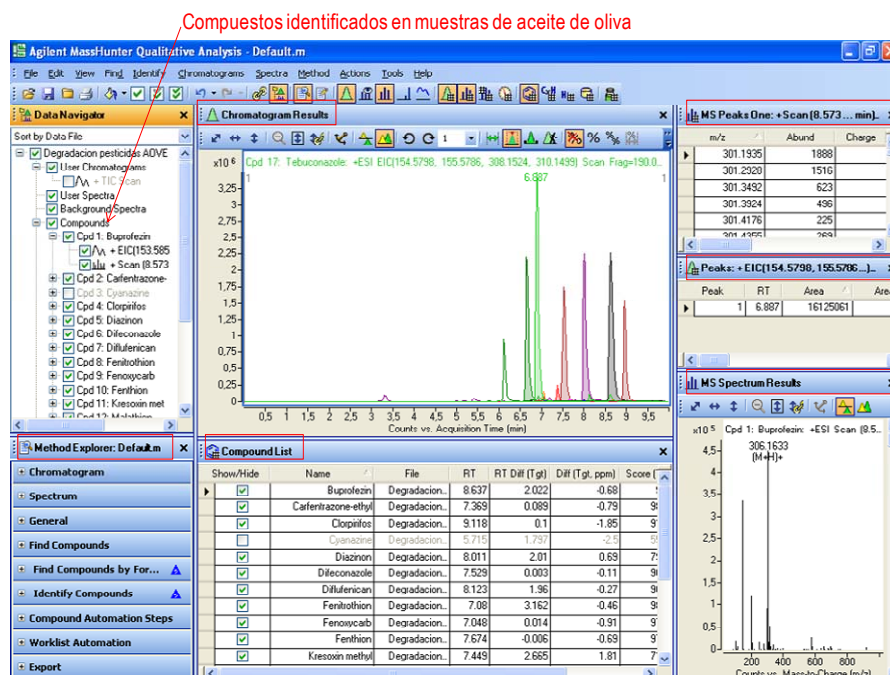


Figura 5.1.4. Imagen del software utilizado para el desarrollo de la base de datos de masa exactas de iones para la determinación de contaminantes orgánicos. Se muestra la identificación de plaguicidas en aceite de oliva.

5.1.3. Resultados y discusión

5.1.3.1. Optimización de la separación cromatográfica

Los primeros experimentos realizados en este estudio se centraron en la optimización de la separación cromatográfica de los plaguicidas investigados. Para ello, en estas primeras pruebas se inyectaron alícuotas de 2 μ L de patrones individuales y de mezclas de los mismos para así poder identificar todos los compuestos mediante sus tiempos de retención (t_R). En la Tabla 5.1.2. y 5.1.3. se han incluido los tiempos de retención, la composición elemental del compuesto originario y su fragmento o iones producto para cada compuesto bajo las condiciones óptimas de cada equipo.

El método LC-TOFMS, se ha empleado como voltaje de fragmentación en la fuente 190 V, como un valor óptimo para obtener la sensibilidad de la molécula protonada (utilizada para la cuantificación de los analitos) y la información adicional proporcionada por los fragmentos a efectos de confirmación. Con 190 V, al menos un fragmento podía servir para la confirmación de los compuestos, excepto para amitrole, carbaryl, diflufenican, oxyflourfen, pyrimiphos methyl, procymidone, simazine y tebuconazole, para los que no se observó una fragmentación significativa. Para casi todos los plaguicidas estudiados el ion más abundante era la molécula protonada, que fue utilizada para la cuantificación de los mismos (ver Tabla 5.1.2).

Tabla 5.1.2. Identificación de plaguicidas en aceite de oliva mediante LC-TOFMS: tiempos de retención (t_R), y medidas de masa exacta de las moléculas protonadas y los principales fragmentos de los plaguicidas estudiados en aceite de oliva a un nivel de 10 $\mu\text{g/Kg}$.

	Compuesto	t_R	ion	Composición elemental	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)
1	Amitrole	0.929	$[M+H]^+$	$\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$	85.0509	85.0514	-
2	Ametryn	3.869	$[M+H]^+$	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_5\text{S}$	228.1283	228.1278	0.09
		3.869	Frg.1	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_5\text{S}$	186.0807	186.0808	0.73
3	Atrazine	4.247	$[M+H]^+$	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$	216.101	216.1014	1.55
			Frg 1	$\text{C}_5\text{H}_{18}\text{ClN}_5$	174.0544	174.0541	1.70
			Frg 2	$\text{C}_3\text{H}_4\text{ClN}_5$	146.023	146.0228	1.48
			Frg 3	$\text{C}_4\text{H}_6\text{ClN}_3$	132.0324	132.0323	0.90
4	Buprofezin	6.675	$[M+H]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{OS}$	306.1659	306.1635	0.40
			Frg 1	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2$	301.1414	301.1416	3.06
			Frg 2	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$	250.1006	250.1009	0.97
			Frg 3	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{OS}$	201.1055	201.1056	0.71
			Frg 4	$\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_3$	149.0236	149.0233	2.07
			Frg 5	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NS}$	116.0527	116.0528	0.87
			Frg 6	$\text{C}_7\text{H}_7\text{N}$	106.065	106.0651	0.71
5	Carbaryl	3.850	$[M+H]^+$	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	202.0863	202.0858	1.80
			Frg 1	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$	145.0648	145.0650	1.18
6	Carfentazone ethyl	5.403	$[M+H]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$	412.0437	412.0439	0.42
			Frg 1	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$	384.0124	384.0124	0.15
			Frg 2	$\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$	366.0017	366.0007	0.59
			Frg 3	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2$	219.1856	219.1856	0.06
7	Cyanazine	3.897	$[M+H]^+$	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{ClN}_6$	241.0963	241.0865	0.71
			Frg 1	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClN}_5$	214.0859	214.0854	2.51
			Frg 2	$\text{C}_5\text{H}_8\text{ClN}_5$	174.0537	174.0541	2.38
8	Chlorpyrifos	7.170	$[M+H]^+$	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$	349.9336	349.9336	0.50
			Frg 1	$\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$	321.9014	321.9023	2.20
			Frg 2	$\text{C}_4\text{HCl}_3\text{NO}_6\text{P}$	295.8681	295.8680	0.26
			Frg 3	$\text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{P}$	197.9271	197.9273	0.76
9	Chlorotoluron	4.107	$[M+H]^+$	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$	213.0789	213.0789	0.43
			Frg 1	$\text{C}_8\text{H}_6\text{ClNO}$	168.0207	168.0211	1.97
			Frg 2	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$	107.0492	107.0491	0.44
			Frg 3	$\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$	72.0448	72.0444	6.20
10	Desmetryn	3.548	$[M+H]^+$	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}$	214.1121	214.1124	1.39
			Frg 1	$\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_5\text{S}$	172.0650	172.0651	0.69
			Frg 2	$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3$	82.0400	82.0400	0.63
11	Diazinon	6.001	$[M+H]^+$	$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$	305.1083	305.1083	0.50
			Frg 1	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$	169.0791	169.0794	1.57
			Frg 2	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$	153.1019	153.1022	2.03
12	Difenoconazole	5.568	$[M+H]^+$	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$	406.072	406.072	0.56
			Frg 1	$\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}$	251.0021	251.0025	1.49
13	Diffufenican	6.163	$[M+H]^+$	$\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_2$	395.0813	395.0813	0.21

	Compuesto	t_R	ion	Composición elemental	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)
14	Dimethametryn	4.587	$[M+H]^+$	$C_{11}H_{21}N_5S$	256.1590	256.1591	0.19
			Frg 1	$C_6H_{11}N_5S$	186.0808	186.0808	0.19
			Frg 2	$C_{10}H_{21}NO$	172.1692	172.1696	2.19
15	Dimethoate	3.454	$[M+H]^+$	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	230.0069	230.0066	0.08
			Frg 1	$C_4H_7O_3PS_2$	198.9646	198.9647	0.40
			Frg 2	$C_3H_7O_2PS_2$	170.9697	170.9698	0.65
			Frg 3	$C_4H_2N_2O_2S$	142.9924	142.991	9.93
			Frg 4	C_3H_5NS	88.0219	88.0215	3.99
16	Diuron	4.249	$[M+H]^+$	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	233.0249	233.0244	0.37
			Frg 1	$C_{12}H_{19}NO$	194.1539	194.1539	0.48
			Frg 2	C_3H_5NO	72.045	72.0444	8.14
17	Fenitrothion	3.918	$[M+H]^+$	$C_9H_{12}NO_5PS$	278.0247	278.0247	1.19
			Frg 1	$C_8H_8NO_4PS$	245.9977	245.9984	3.21
18	Fenoxycarb	5.089	$[M+H]^+$	$C_{17}H_{19}NO_4$	302.1387	302.1387	0.73
			Frg 1	$C_{15}H_{13}NO_3$	256.097	256.0968	0.62
			Frg 2	$C_5H_9NO_2$	116.0706	116.0706	0.34
			Frg 3	$C_3H_5NO_2$	88.0397	88.0393	4.09
19	Fenthion	5.700	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	279.0273	279.0273	1.02
			Frg 1	$C_9H_{11}O_2PS_2$	247.0011	247.001	0.16
			Frg 2	$C_8H_8S_2$	169.014	169.014	0.17
20	Kresoxin methyl	4.784	$[M+H]^+$	$C_{18}H_{19}NO_4$	314.1387	314.1387	0.81
			Frg 1	$C_{17}H_{15}NO_3$	282.1125	282.1125	0.08
			Frg 2	$C_{17}H_{14}O_3$	267.1017	267.1016	0.59
			Frg 3	$C_{16}H_{15}NO_2$	254.118	254.1176	1.57
			Frg 4	$C_{16}H_{15}NO$	238.1227	238.1226	0.08
			Frg 5	$C_{11}H_{11}NO_3$	206.0812	206.0812	0.14
			Frg 6	$C_{10}H_{11}NO$	162.0913	162.0913	0.16
			Frg 7	C_9H_9N	132.08	132.0808	5.89
21	Malathion	5.106	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	331.0433	331.0431	0.66
			Frg 1	$C_8H_{13}O_5PS_2$	285.0014	285.0015	0.26
			Frg 2	$C_7H_{13}O_4PS_2$	257.0064	257.0066	0.54
			Frg 3	$C_5H_7O_3PS_2$	210.9648	210.9647	0.63
			Frg 4	$C_6H_6O_3$	127.039	127.039	0.07
			Frg 5	$C_4H_2O_3$	99.0079	99.0077	2.07
22	Norflurazone	6.028	$[M+H]^+$	$C_{12}H_9ClF_3N_3O$	304.0459	304.0459	0.5
			Frg 1	$C_{11}H_{13}FN_2O_6$	289.0834	289.083	1.07
23	Oryzalin	4.957	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{18}N_4O_6S$	347.102	347.102	0.35
			Frg 1	$C_9H_{12}N_4O_6S$	305.0545	305.055	1.60
24	Oxadiazon	7.055	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_3$	345.0767	345.0764	0.88
			Frg 1	$C_{12}H_{12}Cl_2N_2O_3$	303.0292	303.0298	1.15
			Frg 2	$C_9H_{18}N_6O$	227.1619	227.1615	1.67
25	Oxyflourfen	8.501	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$	362.0401	362.0401	0.03
26	Parathion ethyl	7.463	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{14}O_5PS$	292.0403	292.0405	0.64
			Frg 1	$C_8H_{10}NO_5PS$	264.0087	264.009	1.06

	Compuesto	t_R	ion	Composición elemental	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)
			Frg 2	C ₆ H ₆ NO ₅ PS	235.9775	235.9777	0.83
			Frg 3	C ₈ H ₂₄ N ₅ P	222.1831	222.1842	5.01
27	Pendimethalin	7.220	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	282.1448	282.1449	0.12
28	Phosalone	6.014	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₅ CINO ₄ PS ₂	367.9941	367.9936	1.39
			Frg 1	C ₈ H ₄ CINO ₂	182.0004	182.0003	0.28
			Frg 2	C ₇ H ₄ CIN	138.0107	138.0105	1.54
			Frg 3	C ₃ H ₆ O ₄ S	139.0062	139.006	1.86
29	Pirimiphos methyl	6.238	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	306.1036	306.1035	0.13
30	Procymidone	5.219	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	284.024	284.024	0.43
31	Propiconazole	9.875	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	342.0771	342.0773	0.69
			Frg 1	C ₇ H ₄ Cl ₂	158.9763	158.9763	0.14
32	Propazine	4.600	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₆ CIN ₅	230.1167	230.1168	0.57
			Frg 1	C ₆ H ₁₀ CIN ₅	188.0695	188.0697	1.63
33	Pyriproxifen	7.009	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	322.1438	322.1438	0.97
			Frg 1	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	227.1067	227.1067	0.28
			Frg 2	C ₁₂ H ₈ O ₂	185.0595	185.0597	0.54
			Frg 3	C ₅ H ₅ NO	96.0447	96.0444	3.18
34	Simazine	3.938	[M+H] ⁺	C ₇ H ₁₂ CIN ₅	202.0854	202.0857	1.36
35	Tebuconazole	4.939	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ CIN ₃ O	308.1524	308.1527	0.82
36	Terbutylazine	4.600	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₆ CIN ₅	230.1167	230.1171	1.87
			Frg 1	C ₅ H ₈ CIN ₅	174.0543	174.0541	1.16
37	Terbutryn	4.337	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	242.1434	242.1437	1.36
			Frg 1	C ₆ H ₁₁ N ₅ S	186.0807	186.0808	0.24
38	Terbumeton	3.464	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	226.1662	226.1662	0.55
			Frg 1	C ₆ H ₁₁ N ₅ S	170.1035	170.1036	0.58
39	Thiabendazole	4.38	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	202.0433	202.0438	2.09
			Frg 1	C ₉ H ₆ N ₂ S	175.0327	175.0324	1.67

[M+H]⁺: Molécula protonada

Error: diferencia entre m/z experimental y m/z teórica (de la composición elemental asignada)

Las medidas de masa exacta se llevaron a cabo según el siguiente procedimiento: A partir del cromatograma de iones totales (TIC) se extrae la relación masa-carga (m/z) teórica de cada analito con una ventana de masa de 20 ppm. De este modo se obtiene el cromatograma de ion extraído (EIC). Se realizó la cuantificación de los compuestos estudiados utilizando la masa exacta de la molécula protonada. A efectos de confirmación se utilizaron los fragmentos de cada compuesto. En la Tabla 5.1.2. se muestran los resultados obtenidos para la identificación y confirmación de los 39 plaguicidas analizados en aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 10 µg/Kg. Como se puede observar, la exactitud de masa es excelente, con errores

inferiores a 2 ppm (error de masa relativo), en la mayoría de los casos. En resumen, las medidas de masa exacta de la molécula protonada junto con los fragmentos característicos y el tiempo de retención, permiten la identificación y confirmación de los plaguicidas estudiados a bajos niveles de concentración.

Tabla 5.1.3. Identificación de residuos de plaguicidas y PAHs en aceite de oliva mediante GC-MS/MS: tiempo de retención (t_R), ion precursor e iones producto.

	Compuesto	Uso	t_R	Ion precursor m/z	Iones producto		
					m/z	m/z	m/z
1	1,2,3-Trichlorobenzene	Insecticida	8.37	181.8	146.8	108.8	110.9
2	1,2,4-Trichlorobenzene	Insecticida	7.83	181.8	108.8	146.8	110.9
3	1,3,5-Trichlorobenzene	Insecticida	7.05	181.8	108.8	146.8	110.9
4	4,4'-DDE	Insecticida	25.86	318.0	246.0	248.0	283.0
5	4,4'-DDT	Insecticida	28.65	235.0	164.9	200.0	199.0
6	Acenaphthylene	PAHs	11.91	152.0	152.1	151.1	
7	Alachlor	Herbicida	20.09	188.1	160.0	131.0	132.0
8	Aldrin	Insecticida	21.92	262.8	192.7	190.8	228.0
9	α -Cypermethrin	Insecticida	35.01	163.0	90.9	126.9	152.1
10	α -Endosulfan	Insecticida	24.98	338.8	160.1	194.9	230.9
11	α -HCH	Insecticida	15.51	218.9	182.8	146.9	108.8
12	Anthracene	PAHs	17.96	178.0	178.1	152.1	
13	Atrazine desethyl	Herbicida	14.72	172.0	105.0	172.0	94.0
14	Benzo(a)anthracene	PAHs	30.32	228.0	228.0	226.0	
15	Benzo(a)pyrene	PAHs	35.99	252.0	252.0	252.0	
16	Benzo(b)fluoranthene	PAHs	34.70	252.0	252.0	252.0	
17	Benzo(ghi)perylene	PAHs	41.31	276.0	276.0	274.0	
18	Benzo(k)fluoranthene	PAHs	34.81	252.0	252.0	252.0	
19	β -Endosulfan	Insecticida	27.20	338.8	266.7	160.0	230.8
20	β -HCH	Insecticida	16.79	218.9	182.8	144.8	108.9
21	Chlorfenvinfos A	Insecticida	23.29	323.0	267.0	295.0	159.0
22	Chlorfenvinfos B	Insecticida	23.71	323.0	267.0	295.0	159.0
23	Crisene	PAHs	30.47	228.0	228.0	226.0	
24	δ -HCH	Insecticida	18.59	218.9	182.8	144.8	108.9
25	Deltamethrin	Insecticida	38.38	252.9	93.0	174.0	90.9
26	Dibenzo(ah)anthracene	PAHs	40.52	278.0	278.0	250.0	
	Compuesto	Uso	t_R	Ion precursor m/z	Iones producto		
					m/z	m/z	m/z

27	Dieldrin	Insecticida	26.01	262.8	192.7	190.8	227.9
28	Endosulfan sulfate	Insecticida	28.53	386.8	252.9	288.9	205.7
29	Endrin	Insecticida	26.76	262.8	192.7	190.8	228.0
30	Ethion	Insecticida	27.34	231.0	129.0	157.0	185.0
31	Fenamiphos	Insecticida	24.92	303.0	195.0	153.9	288.0
32	Fluorene	PAHs	13.68	166.0	165.1	166.0	
33	γ -HCH	Insecticida	16.95	218.9	182.8	144.8	108.9
34	Heptachlor	Contaminante ambiental	20.36	272.0	237.0	272.1	143.0
35	Hexachlorobenzene	Contaminante ambiental	15.61	283.8	248.7	141.8	178.7
36	Hexaclorobutadieno	Contaminante	8.31	224.9	189.8	154.9	152.7
37	Indene(1,2,3-cd)pyrene	PAHs	40.37	276.0	276.0	274.0	
38	Iprodione	Insecticida	30.03	314.0	245.0	271.0	55.9
39	Isodrin	Insecticida	23.14	262.8	192.7	190.8	228.0
40	Isoproturon	Herbicida	8.56	161.1	146.1	128.0	91.0
41	λ -Cyhalothrin	Insecticida	31.61	197.0	141.0	161.0	126.9
42	Metoxychlor	Insecticida	30.51	227.0	169.0	212.1	184.0
43	Parathion methyl	Insecticida	20.11	263.0	109.1	127.1	246.0
44	Pentachlorobenzene	Insecticida	12.60	249.8	214.8	142.0	107.8
45	Phenanthrene	PAHs	17.67	178.0	178.1	152.1	178.1
46	Prometon	Herbicida	15.89	225.0	183.1	168.0	210.0
47	Pyrene	PAHs	24.98	202.1	202.0	201.2	
48	Trifluralin	Herbicida	14.30	306.1	264.0	206.0	159.8

El empleo de la GC-MS/MS es especialmente adecuado para el análisis de compuestos volátiles y no polares. El acoplamiento de la cromatografía de gases con espectrometría de masas proporciona la selectividad suficiente para detectar residuos de plaguicidas y PAHs en aceite de oliva a bajos niveles de concentración. El método analítico GC-MS/MS se optimizó para la determinación de 48 compuestos entre plaguicidas y PAHs, incluyendo los plaguicidas más utilizados en el olivar, tal como se observa en la Tabla 5.1.3.

5.1.3.2. Parámetros analíticos

Para evaluar la linealidad del método se prepararon rectas de calibrado con nueve niveles de concentración comprendidos en el rango 1 – 550 µg/Kg, para LC-TOFMS y en el caso de GC-MS/MS las curvas de calibración se prepararon con cuatro niveles de concentración en el rango aproximado 15 - 800 µg/Kg. Para ambos equipos se realizó una calibración empleando patrones preparados en extracto de aceite de oliva.

En el caso del método LC-TOFMS, la cuantificación se llevó a cabo utilizando las áreas obtenidas en el cromatograma extraído (con una ventana de error de masa de 20 ppm) de la molécula protonada de cada uno de los compuestos de interés. En la Figura 5.1.5 se muestra el TIC de una muestra de aceite de oliva, junto con los EIC de algunos de los compuestos estudiados. Como se puede ver, para un nivel tan bajo de concentración, la relación señal-ruido obtenida es elevada, ilustrando los bajos límites de detección.

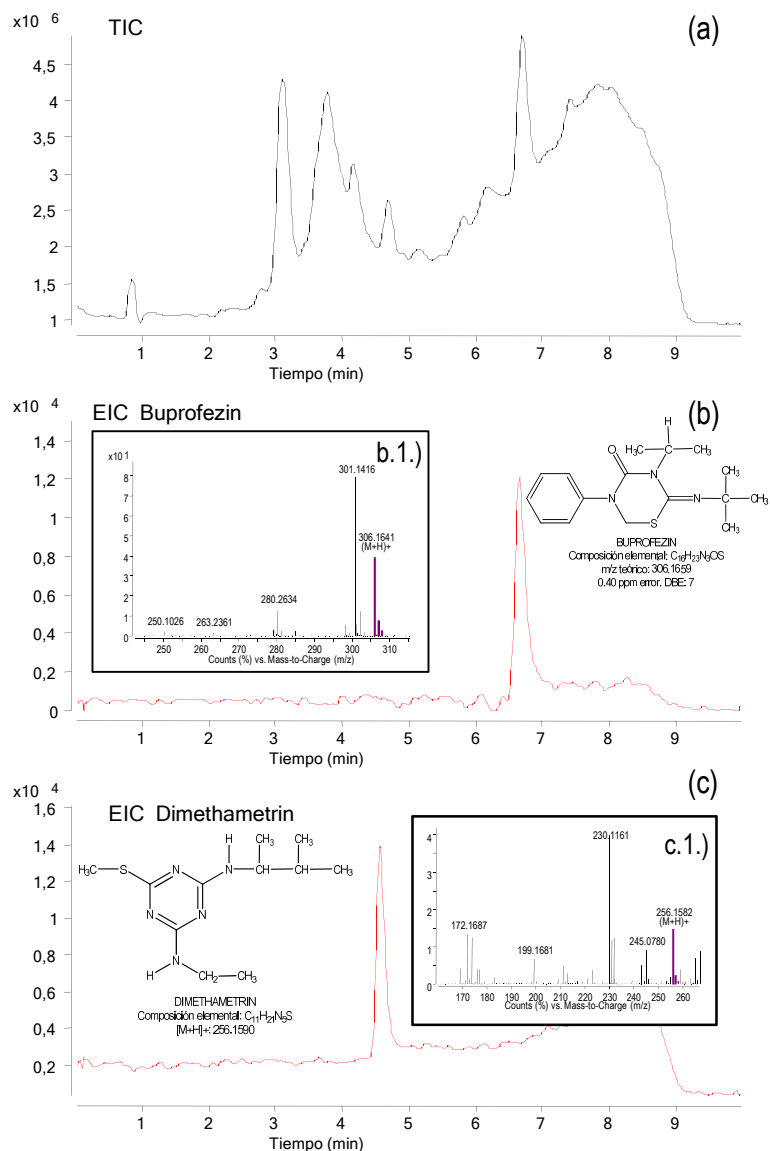


Figura 5.1.5. (a) Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente al análisis de una muestra de aceite de oliva (muestra E-2) mediante LC-TOFMS, en la que fueron detectados 5 plaguicidas en estudio. (b) Cromatogramas extraídos (EICs) de buprofezin (0.017 mg/Kg) (b.1.) recuadro espectro de masa exacta). (c) Cromatogramas extraídos (EICs) de dimethametrin (0.009 mg/Kg) (c.1.): recuadro espectro de masa).

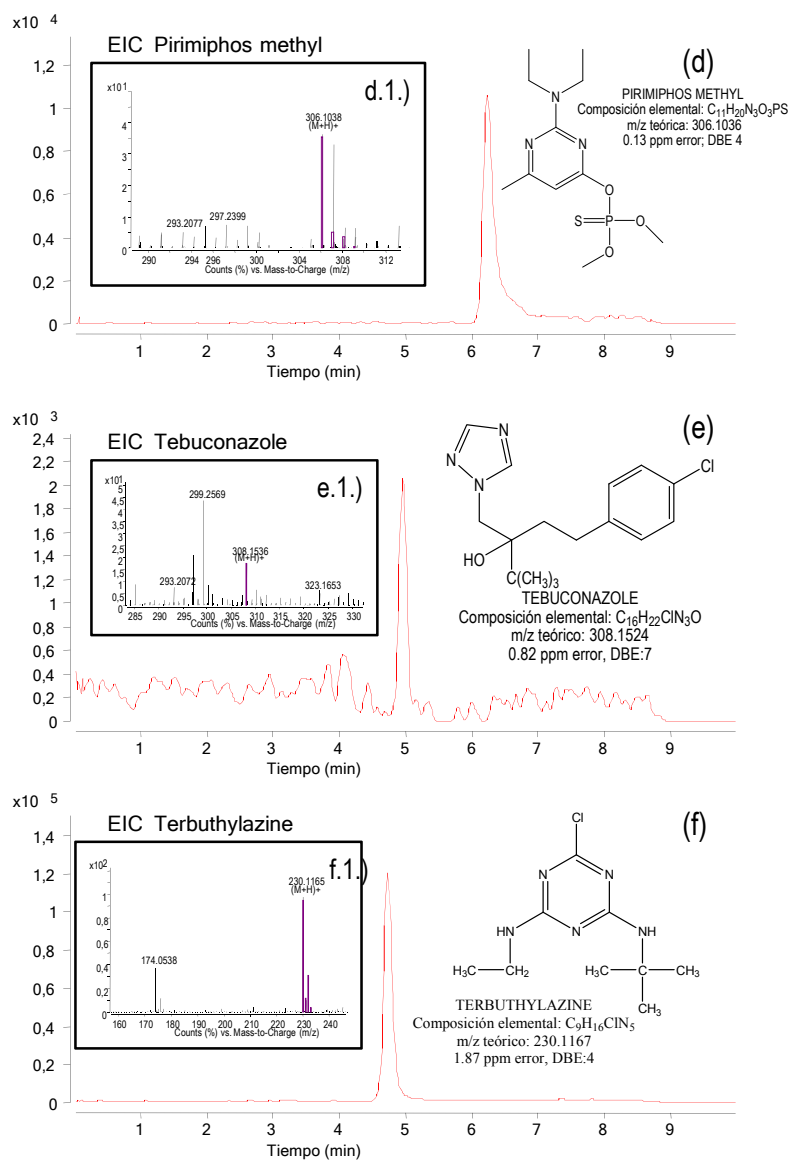


Figura 5.1.5. (Continuación) (d) Cromatogramas extraídos (EICs) de pirimiphos methyl (0.008 mg/Kg) (d.1.): recuadro espectro de masa (e) Cromatogramas extraídos (EICs) de tebuconazole (0.003 mg/Kg) (e.1.) recuadro espectro de masa). (f) Cromatogramas extraídos (EICs) de terbutylazine (0.083 mg/Kg) (f.1.): recuadro espectro de masa).

Como puede verse en las Tablas 5.1.4. y 5.1.5., la linealidad del método es bueno, obteniéndose coeficientes de regresión superiores a 0.990 en todos los casos. Los límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs) se calcularon inyectando patrones en matriz a niveles de concentración bajos. El límite de detección se consideró como aquella concentración correspondientes a una señal – ruido (S/N) próxima a 3. De forma análoga, los límites de cuantificación (LOQs) fueron estimados considerando el criterio $S/N = 10$.

Los analitos como carfentazone ethyl, cyanazine, chlorpirifos, diflufenican, dimethoate, fenitrothion, fenoxycarb, fenthion, kresoxyn methyl, malathion, oryzalin, oxadiazon, oxyflourfen, parathion ethyl, phosalone y procymidone, se tuvieron que analizar por LC-TOFMS en concentraciones más altas debido a la baja sensibilidad de los analitos.

Para el caso de GC-MS/MS, los analitos analizados con menor sensibilidad fueron: α -cypermethrin, chlorpyrifos ethyl, deltamethrin, heptachlor y simazine.

Tabla 5.1.4. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis de plaguicidas en aceite de oliva mediante LC-TOFMS.

	Compuesto	Linealidad		LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)
		Rango (mg/Kg)	R ²		
1	Amitrole	0.001-0.220	0.995	0.001	0.003
2	Ametryn	0.001-0.220	0.997	0.001	0.003
3	Atrazine	0.001-0.220	0.998	0.001	0.003
4	Buprofezin	0.006-0.110	0.992	0.001	0.003
5	Carbaryl	0.001-0.110	0.996	0.001	0.001
6	Carfentazone-ethyl	0.010-0.220	0.999	0.005	0.017
7	Cyanazine	0.010-0.220	0.999	0.004	0.015
8	Chlorpyrifos	0.100-0.550	0.996	0.108	0.358
9	Chlorotoluron	0.001-0.220	0.999	0.001	0.003
10	Desmetryn	0.001-0.220	0.998	0.003	0.010
11	Diazinon	0.001-0.220	0.997	0.003	0.009
12	Difenoconazole	0.001-0.220	0.997	0.001	0.001
13	Diflufenican	0.010-0.220	0.997	0.003	0.012
14	Dimethametryn	0.0010-0.220	0.996	0.001	0.002
15	Dimethoate	0.030-0.220	0.996	0.012	0.040
16	Diuron	0.001-0.220	0.990	0.001	0.001
17	Fenitrothion	0.030-0.220	0.992	0.013	0.042
18	Fenoxycarb	0.010-0.220	0.999	0.004	0.014
19	Fenthion	0.010-0.220	0.997	0.009	0.028
20	Kresoxin methyl	0.030-0.220	0.994	0.024	0.081
21	Malathion	0.010-0.220	0.998	0.009	0.029
22	Norflurazone	0.010-0.220	0.999	0.002	0.006
23	Oryzalin	0.030-0.220	0.998	0.012	0.041
24	Oxadiazon	0.030-0.220	0.993	0.013	0.043
25	Oxyflourfen	0.100-0.600	0.991	0.053	0.176
26	Parathion ethyl	0.100-0.600	0.990	0.061	0.202
27	Pendimethalin	0.220-0.600	0.999	0.163	0.543
28	Phosalone	0.060-0.600	0.997	0.023	0.075
29	Pirimyphos methyl	0.001-0.220	0.995	0.002	0.007
		Linealidad		LOD	LOQ

	Compuesto	Rango (mg/Kg)	R ²	(mg/Kg)	(mg/Kg)
30	Procymidone	0.030-0.556	0.993	0.016	0.052
31	Propazine	0.001-0.600	0.997	0.001	0.003
32	Propiconazole	0.001-1.000	0.991	0.001	0.003
33	Pyriproxifen	0.001-0.600	0.998	0.001	0.002
34	Simazine	0.001-0.600	0.995	0.001	0.001
35	Tebuconazole	0.001-0.220	0.998	0.002	0.006
36	Terbutylazine	0.001-0.220	0.999	0.001	0.003
37	Terbutryn	0.001-0.220	0.997	0.001	0.002
38	Terbumeton	0.010-0.220	0.999	0.002	0.008
39	Thiabendazole	0.001-1.000	0.996	0.001	0.001

Tabla 5.1.5. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis de plaguicidas y PAHs en aceite de oliva mediante GC- MS/MS.

	Compuesto	Linealidad		LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)
		Rango (mg/Kg)	R ²		
1	1,2,3-Trichlorobenzene	0.015-0.8	0.998	0.006	0.021
2	1,2,4-Trichlorobenzene	0.015-0.8	0.999	0.006	0.019
3	1,3,5-Trichlorobenzene	0.015-0.8	0.999	0.005	0.018
4	4,4'-DDE	0.015-0.8	0.994	0.008	0.027
5	4,4'-DDT	0.015-0.8	0.99	0.005	0.017
6	Acenaphthylene	0.015-0.8	0.997	0.043	0.114
7	Alachlor	0.015-0.8	0.995	0.006	0.019
8	Aldrin	0.015-0.8	0.996	0.005	0.017
9	α -Cypermethrin	0.080-0.8	0.997	0.026	0.085
10	α -Endosulfan	0.015-0.8	0.996	0.005	0.017
11	α -HCH	0.015-0.8	0.998	0.005	0.015
12	Anthracene	0.015-0.8	0.995	0.005	0.017
13	Atrazine desethyl	0.015-0.8	0.999	0.005	0.015
14	Benzo(a)anthracene	0.015-0.8	0.999	0.005	0.017
15	Benzo(a)pyrene	0.015-0.8	0.993	0.006	0.019
		Linealidad		LOD	LOQ

	Compuesto	Rango (µg/Kg)	R ²	(µg/Kg)	(µg/Kg)
16	Benzo(b)fluoranthene	0.015-0.8	0.992	0.007	0.022
17	Benzo(ghi)perylene	0.015-0.8	0.994	0.005	0.017
18	Benzo(k)fluoranthene	0.015-0.8	0.992	0.006	0.019
19	β-Endosulfan	0.015-0.8	0.992	0.005	0.016
20	β-HCH	0.015-0.8	0.998	0.006	0.020
21	Chlorfenvinfos A	0.015-0.8	0.999	0.005	0.016
22	Chlorfenvinfos B	0.015-0.8	0.994	0.008	0.027
23	Chlorpyrifos ethyl	0.080-0.8	0.994	0.083	0.025
24	Crisene	0.015-0.8	0.99	0.005	0.017
25	δ-HCH	0.015-0.8	0.997	0.006	0.020
26	Deltamethrin	0.080-0.8	0.995	0.024	0.081
27	Dibenzo(ah)anthracene	0.015-0.8	0.994	0.005	0.015
28	Dieldrin	0.015-0.8	0.997	0.005	0.017
29	Endosulfan sulfate	0.015-0.8	0.995	0.007	0.023
30	Endrin	0.015-0.8	0.999	0.006	0.019
31	Ethion	0.015-0.8	0.997	0.009	0.029
32	Fenamiphos	0.015-0.8	0.994	0.005	0.016
33	Fluorene	0.015-0.8	0.995	0.006	0.021
34	γ-HCH	0.015-0.8	0.999	0.006	0.019
35	Heptachlor	0.080-0.8	0.991	0.027	0.091
36	Hexachlorobenzene	0.015-0.8	0.998	0.005	0.016
37	Hexaclorobutadieno	0.015-0.8	0.997	0.007	0.022
38	Indene(1,2,3-cd)pyrene	0.015-0.8	0.997	0.005	0.018
39	Iprodione	0.015-0.8	0.998	0.005	0.015
40	Isodrin	0.015-0.8	0.992	0.007	0.023
41	Isoproturon	0.015-0.8	0.997	0.005	0.016
42	λ-Cyhalothrin	0.015-0.8	0.999	0.005	0.016
43	Metoxychlor	0.015-0.8	0.992	0.006	0.019
44	Parathion methyl	0.015-0.8	0.991	0.005	0.017
		Linealidad		LOD	LOQ

	Compuesto	Rango (mg/Kg)	R ²	(mg/Kg)	(mg/Kg)
45	Pentachlorobenzene	0.015-0.8	0.998	0.115	0.015
46	Phenanthrene	0.015-0.8	0.994	0.055	0.018
47	Prometon	0.015-0.8	0.999	0.005	0.016
48	Pyrene	0.015-0.8	0.999	0.006	0.020
49	Trifluralin	0.015-0.8	0.998	0.016	0.005

5.1.3.3. Análisis de muestras reales

El método propuesto se aplicó al análisis de 56 muestras de aceite de oliva de diferentes regiones productoras (ver Tabla 5.1.1 y 5.1.2). Las muestras pertenecían a los siguientes países: Argentina (5), Chile (6), España (5), Francia (1), Grecia (1), Italia (1), Marruecos (4), Perú (31), Portugal (1) y Siria (1) (ver Tabla 5.1.6.).

Tabla 5.1.6. Distribución de las muestras analizadas de aceite de oliva por país.

	País	Total de Muestras	Número de muestras positivas	% Muestras positivas
1	Argentina	5	3	60.00
2	Chile	6	6	100.00
3	España	5	5	100.00
4	Francia	1	0	0.00
5	Grecia	1	0	0.00
6	Italia	1	1	100.00
7	Marruecos	4	1	25.00
8	Perú	31	22	70.97
9	Portugal	1	1	100.00
10	Siria	1	1	100.00
	TOTAL	56	40	71.43

De las 56 muestras analizadas sólo el 28.57%, estaban libres de residuos de los plaguicidas estudiados. El resto de las muestras dieron resultados positivos, de forma

que el 41% de los aceites contenía residuos de un plaguicida, el 16% contenían dos plaguicidas, el 5% contenía al menos 3 plaguicidas y el 9% de las muestras estudiadas contenía 4 o más plaguicidas, tal como se observa en la Figura 5.1.6. De estos encontrados podemos mencionar que, se encontraron diez clases distintas de plaguicidas a concentraciones relevantes en una misma muestra (CH-4). No se debe olvidar que la presencia de más de un compuesto puede potenciar el efecto tóxico que cada uno de ellos ejerce por separado. El efecto combinado de una mezcla de plaguicidas puede ser más nocivo que la suma de los efectos individuales de los mismos [249]. Por otra parte, hay que destacar que el 29% de las muestras procedentes de Perú (9) no contenían plaguicidas.

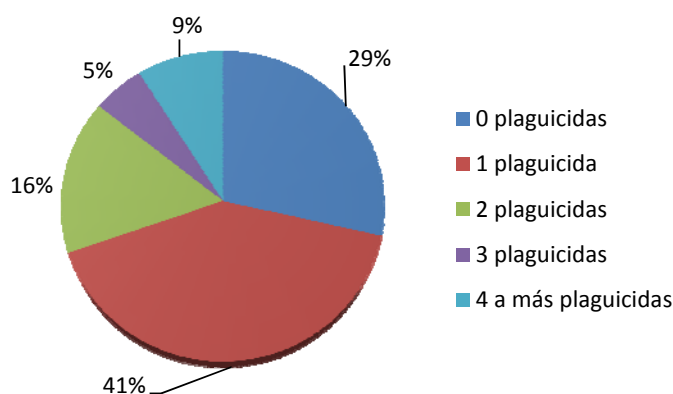


Figura 5.1.6. Evaluación de la presencia de plaguicidas en las muestras de aceite de oliva en estudio. Porcentaje de muestras con 0,1, 2, 3, 4 a más residuos de plaguicidas detectados.

Como puede verse en la Figura 5.1.7. las concentraciones medias totales de los plaguicidas encontrados en las muestras de aceite de oliva, el mayor promedio se halla en las muestras de Chile y España, con 0.179 y 0.124 mg/Kg de plaguicidas respectivamente.

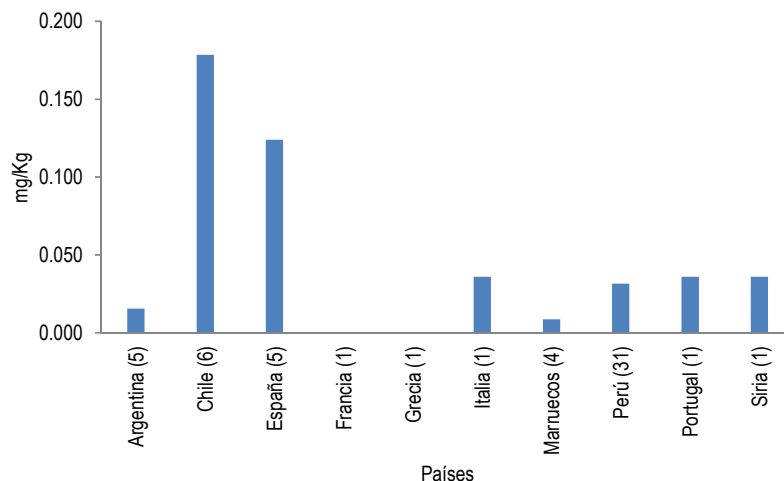


Figura 5.1.7. Concentraciones medias totales (expresadas en mg/Kg) de los plaguicidas encontrados en las muestras de aceite de oliva, ordenadas por países. El número de muestras analizadas aparece entre paréntesis al lado de cada país.

El contenido total de contaminantes orgánicos en una muestra de aceite de oliva virgen extra se calcula como la suma de las concentraciones de los compuestos encontradas en la muestra, se muestran la concentración total de plaguicidas detectados en las muestras de aceite de oliva estudiadas, clasificadas por países, tal como se muestran en la Figura 5.1.8. y la Tabla 5.1.7.

Los plaguicidas detectados más frecuentemente fueron principalmente insecticidas: buprofezin (46.43% muestras), phenanthrene (42.86%) y pirimiphos methyl (12.50% respectivamente), en la Figura 5.1.9, se observa una gráfica con la frecuencia de distribución de cada uno de los compuestos detectados. Los compuestos principales que se encontraron en las muestras europeas son los herbicidas y en las muestras de América del Sur insecticidas. Los herbicidas son aplicados tanto durante el periodo de cultivo como durante el periodo post-cosecha con la finalidad de evitar el crecimiento de la maleza del campo y los insecticidas para el control de plagas (mosca del olivo).

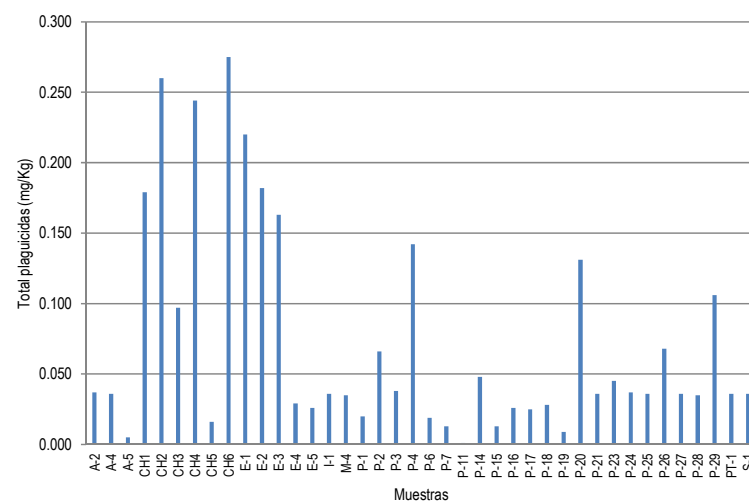


Figura 5.1.8. Concentración total de plaguicidas detectados en muestras de aceite de oliva virgen estudiadas, expresado en mg/Kg.

Tabla 5.1.7. Concentración de plaguicidas detectados en las muestras de aceite de oliva virgen estudiadas: buprofezin (BPF), chlorotoluron (CHLT), chlorpyrifos ethyl (CHE), difeconazole (DFC), dimethametryn (DMT), diuron (DR), phenanthrene (PHEN), pirimiphos methyl (PRM), terbutylazine (TRB) y terbutryn (TRBT), concentración expresada en mg/Kg.

Código	BPF	CHLT	CHE	DFC	DMT	DR	PHEN	PRM	TRB	TRBT	R.P.	Total mg/Kg
A-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
A-2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.037	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.037
A-3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
A-4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036
A-5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.005	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.005
CH1	0.143	N.D.	<LOQ	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.179
CH2	0.015	N.D.	0.209	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.260
CH3	0.061	N.D.	<LOQ	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.097
CH4	0.069	N.D.	0.113	N.D.	N.D.	0.015	0.038	N.D.	0.004	0.005	N.D.	0.244
CH5	0.016	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.016
CH6	0.03	N.D.	0.207	N.D.	N.D.	0.001	0.037	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.275
E-1	0.018	0.026	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	0.036	0.009	0.121	N.D.	N.D.	0.220
E-2	0.017	0.029	N.D.	N.D.	0.009	N.D.	0.036	0.008	0.083	N.D.	N.D.	0.182
E-3	0.013	N.D.	N.D.	N.D.	0.008	N.D.	N.D.	0.009	0.133	N.D.	N.D.	0.163
E-4	0.014	N.D.	N.D.	N.D.	0.008	N.D.	N.D.	0.007	N.D.	N.D.	N.D.	0.029
E-5	0.012	N.D.	N.D.	N.D.	0.007	N.D.	N.D.	0.007	N.D.	N.D.	N.D.	0.026
F-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
G-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
I-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036
M-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
M-2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
M-3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
M-4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.035	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.035
Código	BPF	CHLT	CHE	DFC	DMT	DR	PHEN	PRM	TRB	TRBT	R.P.	Total mg/Kg
P-1	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.020
P-2	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.066

P-3	0.038	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.038
P-4	0.106	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.142
P-5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-6	0.019	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.019
P-7	0.013	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.013
P-8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-11	N.D.	N.D.	N.D.	0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.001
P-12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-14	0.048	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.048
P-15	0.013	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.013
P-16	0.026	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.026
P-17	0.025	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.025
P-18	0.018	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.028
P-19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.009	N.D.	N.D.	N.D.	0.009
P-20	0.095	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.131
P-21	N.D.	N.D.	<LOQ	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036
P-22	N.D.	N.D.	<LOQ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-23	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.035	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.045
P-24	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.037	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.037
P-25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036
<i>Código</i>	<i>BPF</i>	<i>CHLT</i>	<i>CHE</i>	<i>DFC</i>	<i>DMT</i>	<i>DR</i>	<i>PHEN</i>	<i>PRM</i>	<i>TRB</i>	<i>TRBT</i>	<i>R.P.</i>	<i>Total mg/Kg</i>
P-26	0.032	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.068
P-27	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036
P-28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.035	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.035
P-29	0.07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.106
P-30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
P-31	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000
PT-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036

S-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.036

R.P. Resto de plaguicidas estudiados

N.D. No Detectado

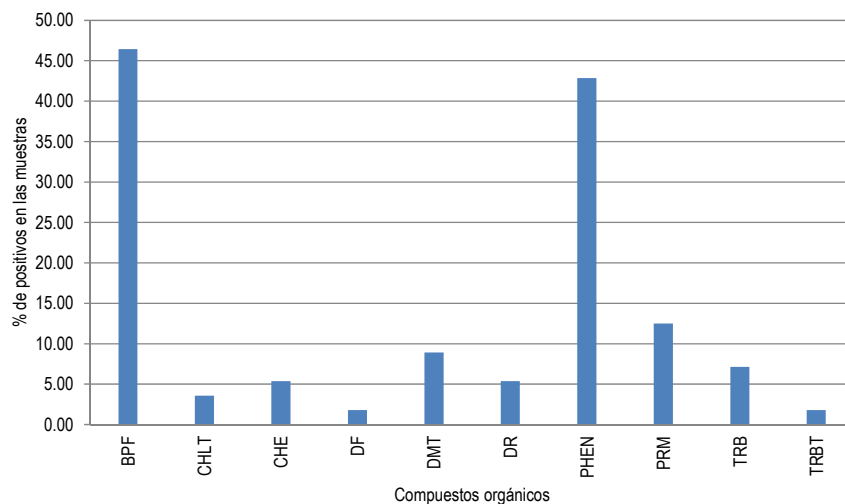


Figura 5.1.9. Plaguicidas encontrados en las muestras de aceite de oliva estudiadas (expresado en porcentaje (%) sobre el total de muestras analizadas).

En la Tabla 5.1.8., se observan la identificación de 21 compuestos de los 540 plaguicidas de la base de datos, para la determinación de contaminantes orgánicos en aceite de oliva, entre los que podemos observar la presencia de δ -HCH, compuesto utilizado en la agricultura a inicios de los años 70, su uso en la actualidad está prohibido, según la legislación no tiene que encontrarse residuos en alimentos.

En cuanto a la presencia de los PAHs, se encuentran valores muy bajos, ya que según, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 (UE, 2006) fija para el benzo(a)pireno unos contenidos máximos en determinados productos alimenticios (aceites y grasas, y otros alimentos), que establece un contenido máximo de 2 $\mu\text{g/Kg}$ de peso para aceites y grasas, destinados al consumo humano directo o para su uso como ingredientes en los productos alimenticios.

Tabla 5.1.8. Resultados obtenidos en el análisis de 56 muestras de aceite de oliva, expresado en mg/Kg.

	Compuesto	Frecuencia	% Muestras con residuos	Intervalo de concentración de residuos mg/kg	LMR Aceitunas para la producción de aceite mg/kg	Reglamento UE	Muestras con valores > LMR
1	Buprofezin	26	46.43	0.010-0.143	5.00	[250]	0
2	Chlorotoluron	2	3.57	0.026-0.029	0.05	[251]	0
3	Chlorpyrifos ethyl	3	5.36	0.113-0.209	0.05	[252]	3
4	Difenoconazole	1	1.79	0.001	2.00	[253]	0
5	Dimethametryn	5	8.93	0.007-0.010	-	n/e	0
6	Diuron	3	5.36	0.001-0.015	0.02	[251]	0
7	Phenanthrene	24	42.86	0.035-0.037	-	n/e	0
8	Pirimyphos methyl	7	12.5	0.007-0.010	0.05	[252]	0
9	Terbuthylazine	4	7.14	0.004-0.133	0.05	[251]	3
10	Terbutryn	1	1.79	0.005	-	n/e	0

n/e: No especifica la Regulación

En la Figura 5.1.10. y Figura 5.1.11., se muestran los niveles de concentración encontrados para el chlorpyrifos ethyl y terbuthylazine en las muestras. Se observan valores individuales de concentración mucho mayores que los LMR para ambos compuestos, ya que el valor según la legislación de la UE es de 0.05 mg/Kg para aceitunas para la producción de aceite. En la Tabla 5.1.8. se muestran los compuestos identificados, la frecuencia en la que se encontraron, el porcentaje de muestras con éstos, los rangos de concentración, los LMR según la normativa Europea [251], y las muestras que sobrepasan los valores de LMR. En la tabla también se observa que el 12.5% de las muestras analizadas contenía residuos de chlorpyrifos ethyl, mientras que el 7.15% de las mismas contenía residuos de terbuthylazine. Otro valor importante que el 46.43% de las muestras tienen el buprofezin como plaguicida.

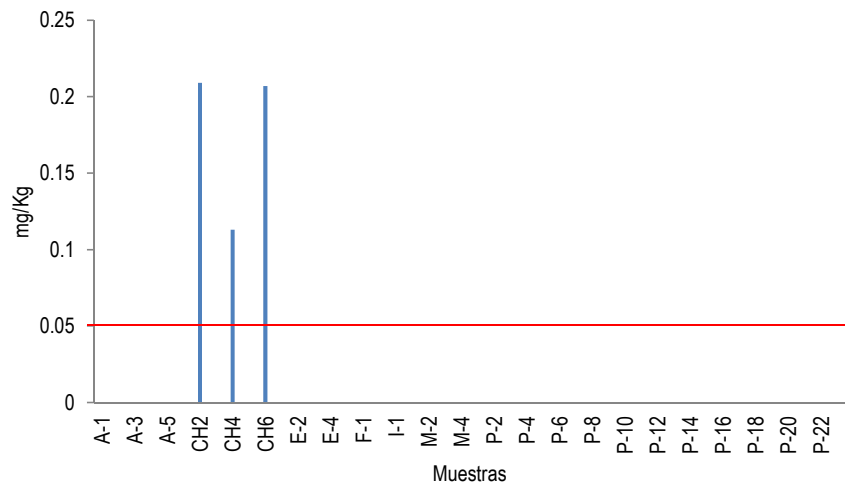


Figura 5.1.10. Concentraciones encontradas de chlorpyrifos ethyl (en mg/Kg) en algunas muestras seleccionadas. El LMRs tolerado para aceitunas para producción de aceite de oliva por la normativa europea para el chlorpyrifos ethyl es 0.050 mg/kg[251].

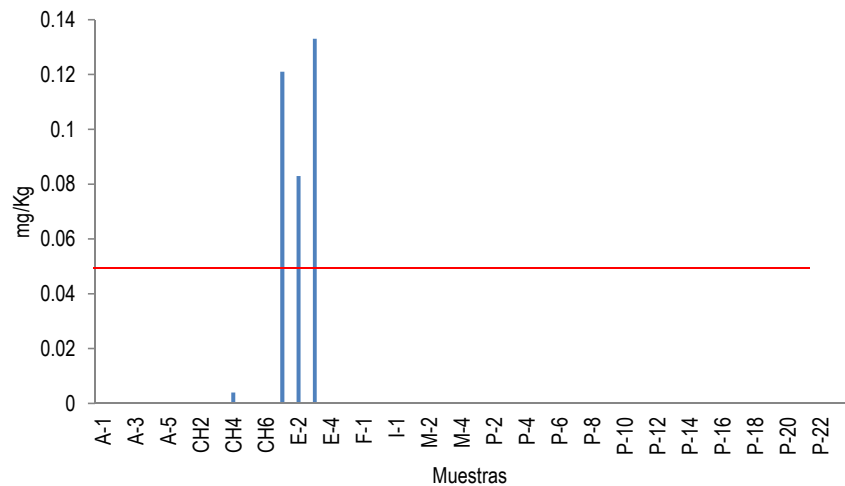


Figura 5.1.11. Concentraciones encontradas de terbuthylazine (en mg/kg) en algunas muestras seleccionadas. El LMRs tolerado para aceitunas para producción de aceite de oliva por la normativa europea para la terbuthylazine es 0.050 mg/kg [252].

5.1.4. Conclusiones

En este trabajo, se ha realizado el primer estudio a nivel mundial de monitoreo de residuos de plaguicidas en aceites de oliva virgen, en el que se analizaron 56 muestras procedentes de 10 países productores, mediante el uso de metodologías basadas en cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) y cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo. A través de estos métodos junto con el empleo de bases de datos de masas exactas de iones, se estudió la presencia de más de 400 compuestos en las diferentes muestras. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de residuos de plaguicidas en el 71 % de las muestras de aceite de oliva virgen analizadas. Los plaguicidas que se detectaron con mayor frecuencia en el aceite de oliva virgen fueron: buprofezin (46.43%), pirimiphos methyl (12.50%) y chlorpyrifos ethyl (5.36%). En 6 de las muestras analizadas se sobrepasaban los límites máximos de residuos establecidos, detectándose concentraciones mayores de los niveles de referencia establecidos por el Reglamento Europeo para el caso del chlorpyrifos ethyl en 3 muestras de Chile y la terbuthylazine en 3 muestras de España.

5.1.5. Anexo (material suplementario)

Tabla A1. Detalle de 416 compuestos de la base de datos [247].

	Compuesto	Composición elemental		Compuesto	Composición elemental
1	α -Cypermethrin	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	29	Anilofos	$C_{13}H_{19}ClNO_3PS_2$
2	λ -Cyhalothrin	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	30	Asulam	$C_8H_{10}N_2O_4S$
3	1-Naphtalene-Acetamide	$C_{12}H_{11}ON$	31	Atrazine	$C_8H_{14}ClN_5$
4	1-Naphtyl-Acetic Acid	$C_{12}H_{10}O_2$	32	Atrazine Desethyl	$C_6H_{10}ClN_5$
5	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	$C_8H_6Cl_2O_3$	33	Atrazine Desisopropyl	$C_5H_8ClN_5$
6	2,4-Dimethylphenol	$C_8H_{10}O$	34	Azaconazole	$C_{12}H_{11}Cl_2N_3O_2$
7	2,4-Dinitrophenol	$C_6H_4N_2O_5$	35	Azinphos Methyl	$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$
8	2-Hydroxybiphenyl	$C_{12}H_{10}O$	36	Azinphos-Ethyl	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS_2$
9	3,3-Dichlorobenzidine	$C_{12}H_{10}Cl_2N_2$	37	Azobenzene	$C_{12}H_{10}N_2$
10	3,5-Dichloroaniline	$C_6H_3NH_2Cl_2$	38	Azoxystrobin	$C_{22}H_{17}N_3O_5$
11	4-Chloro-2-methylphenol	$C_7H_6N_2O_5$	39	Barban	$C_{11}H_9Cl_2NO_2$
12	Abamectin	$C_{48}H_{72}O_{14}$	40	Benalaxyl	$C_{20}H_{23}NO_3$
13	Acephate	$C_4H_{10}NO_3PS$	41	Bendiocarb	$C_{11}H_{13}NO_4$
14	Acetamiprid	$C_{10}H_{11}ClN_4$	42	Benfluralin	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$
15	Acibenzolar S-Methyl	$C_8H_6N_2OS_2$	43	Benfuracarb	$C_{20}H_{30}N_2O_5S$
16	Aclonifen	$C_{12}H_9ClN_2O_3$	44	Bensulfuron Methyl	$C_{16}H_{18}N_4O_7S$
17	Alachlor	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	45	Bensulide	$C_{14}H_{24}NO_4PS_3$
18	Albendazole	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	46	Bentazone	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$
19	Aldicarb	$C_7H_{14}N_2O_2S$	47	Benzidine	$C_{12}H_{12}N_2$
20	Aldicarb Sulfone	$C_7H_{14}N_2O_4S$	48	Bifenazate	$C_{17}H_{20}N_2O_3$
21	Aldicarb Sulfoxide	$C_7H_{14}N_2O_3S$	49	Bifenox	$C_{14}H_9Cl_2NO_5$
22	Allethrin	$C_{19}H_{26}O_3$	50	Bifenthrin	$C_{23}H_{22}ClF_3O_2$
23	Ametryn	$C_9H_{17}N_5S$	51	Bitertanol	$C_{20}H_{23}N_3O_2$
24	Aminocarb	$C_{11}H_{16}N_2O_2$	52	Boscalid	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$
25	Amitraz	$C_{19}H_{23}N_3$	53	Brodifacoum	$C_{31}H_{23}BrO_3$
26	Amitrol	$C_2H_4N_4$	54	Bromacil	$C_9H_{13}BrN_2O_2$
27	Ampa	CH_6NO_3P	55	Bromadiolone Isomer 1	$C_{30}H_{23}BrO_4$
28	Anilazine	$C_9H_5Cl_3N_4$	56	Bromadiolone Isomer 2	$C_{30}H_{23}BrO_5$
	Compuesto	Composición elemental		Compuesto	Composición elemental
57	Bromophos Ethyl	$C_{10}H_{12}BrCl_2O_3PS$	88	Cinosulfuron	$C_{15}H_{19}N_5O_7S$

58	Bromophos Methyl	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS	89	Clodinafop-Propargyl	C ₁₇ H ₁₃ ClFNO ₄
59	Bromoxynil	C ₇ H ₃ ONBr ₂	90	Clofentezine	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄
60	Bromuconazole Isomer 1	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O	91	Clomazone	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂
61	Bromuconazole Isomer 2	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O	92	Clothianidin	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S
62	Bupirimate	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	93	Clothianidin	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S
63	Buprofezine	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	94	Coumaphos	C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS
64	Butachlor	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₂	95	Cyanazine	C ₉ H ₁₃ ClN ₆
65	Butocarboxim	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	96	Cyazofamid	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S
66	Butralin	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₄	97	Cycloate	C ₁₁ H ₂₁ NOS
67	Buturon	C ₁₂ H ₁₃ ClN ₂ O	98	Cycloheximid	C ₁₅ H ₂₃ NO ₄
68	Cadusafos	C ₁₀ H ₂₃ O ₂ PS ₂	99	Cycloxidim	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ S
69	Carbaryl	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	100	Cymoxanil	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃
70	Carbendazim	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	101	Cyphenothrin	C ₂₄ H ₂₅ NO ₃
71	Carbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	102	Cyproconazole	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O
72	Carbofuran 3-Hydroxy	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	103	Cyprodinil	C ₁₄ H ₁₅ N ₃
73	Carbosulfan	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	104	Cyromazin	C ₆ H ₁₀ N ₆
74	Carboxine	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	105	Daminozide	C ₆ H ₁₂ O ₃ N ₂
75	Carfentazone Ethyl	C ₁₅ H ₁₄ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₃	106	Dazomet	C ₅ H ₁₀ N ₂ S ₂
76	Chlorbromuron	C ₉ H ₁₀ BrClN ₂ O ₂	107	Deet	C ₁₂ H ₁₇ NO
77	Chlordimeform	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂	108	Deltamethrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
78	Chlorfenvinfos	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	109	Demeton-S-Methyl	C ₆ H ₁₅ O ₃ PS ₂
79	Chlorfluazuron	C ₂₀ H ₉ Cl ₃ F ₅ N ₃ O ₃	110	Desethyl Terbutylazine	C ₇ H ₁₂ ClN ₅
80	Chloridazon	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	111	Desmedipham	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄
81	Chlormequat chloride	C ₅ H ₁₃ NCI ⁺	112	Desmetryn	C ₈ H ₁₅ N ₅ S
82	Chlorotoluron	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	113	Diafenthiuron	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ OS
83	Chloroxuron	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	114	Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
84	Chlorpyrifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	115	Dibrom	C ₄ H ₇ Br ₂ Cl ₂ O ₄ P
85	Chlorpyrifos Methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	116	Dichlofenthion	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ O ₃ PS
86	Chlorsulfuron	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ O ₄ S	117	Dichlofluanid	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂
87	Cinidon Ethyl	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ NO ₄	118	Dichloran	C ₆ H ₄ N ₂ O ₂ Cl ₂
	<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>		<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>
119	Dichlorvos	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	150	Ethiofencarb Sulfoxide	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S

120	Dicrotophos	C ₈ H ₁₆ NO ₅ P	151	Ethion	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄
121	Diethofencarb	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	152	Ethiprole	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ F ₃ N ₄ OS
122	Difenacoum	C ₃₁ H ₂₄ O ₃	153	Ethofumesate	C ₁₃ H ₁₈ O ₅ S
123	Difenoconazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	154	Ethoxyquin	C ₁₄ H ₁₉ NO
124	Difenoхuron	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃	155	Ethofenprox	C ₂₅ H ₂₈ O ₃
125	Diflubenzuron	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂	156	Etoprophos	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂
126	Diflufenican	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	157	Etoxazole	C ₂₁ H ₂₃ F ₂ NO ₂
127	Dimethametryn	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ S	158	Etriphos	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS
128	Dimethenamid	C ₁₂ H ₁₈ ClNO ₂ S	159	Famoxadone	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄
129	Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	160	Famphur	C ₁₀ H ₁₆ NO ₅ PS ₂
130	Dimethomorph Isomer 1	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	161	Fenamidone	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS
131	Dimethomorph Isomer 2	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	162	Fenamiphos	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS
132	Diniconazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	163	Fenamiphos Sulfone	C ₁₃ H ₂₂ NO ₅ PS
133	Dinocap Isomer 1	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆	164	Fenamiphos Sulfoxide	C ₁₃ H ₂₂ NO ₄ PS
134	Dinocap Isomer 2	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆	165	Fenarimol	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
135	Diphenylamine	C ₁₂ H ₁₁ N	166	Fenazaquin	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O
136	Disulfoton	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	167	Febendazole	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S
137	Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	168	Fenchlorphos	C ₈ H ₈ Cl ₃ O ₃ PS
138	Dmst	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	169	Fenhexamid	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂
139	Edifenphos	C ₁₄ H ₁₅ O ₂ PS ₂	170	Fenhexamid 4-O-Glucoside	C ₂₀ H ₂₇ NO ₇ Cl ₂
140	Emamectin Benzoato	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₃	171	Fenitrothion	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS
141	Epn	C ₁₄ H ₁₄ NO ₄ PS	172	Fenobucarb	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂
142	Epoxiconazole	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	173	Fenoxaprop P-Ethyl	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅
143	Eprinomectin	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₄	174	Fenoxycarb	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄
144	Eptc	C ₉ H ₁₉ NOS	175	Fenpiclonil	C ₁₁ H ₆ Cl ₂ N ₂
145	Etaconazole	C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ O ₂	176	Fenpropathrin	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃
146	Ethalfuralin	C ₁₃ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄	177	Fenpropidine	C ₁₉ H ₃₁ N
147	Ethidimuron	C ₇ H ₁₂ N ₄ O ₃ S ₂	178	Fenpropimorphe	C ₂₀ H ₃₃ NO
148	Ethiofencarb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	179	Fenpyroximate	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄
149	Ethiofencarb Sulfone	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S	180	Fensulfothion	C ₁₁ H ₁₇ O ₄ PS ₂
	<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>		<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>
181	Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	212	Hydramethylnon	C ₂₅ H ₂₄ F ₆ N ₄

182	Fenuron	C ₉ H ₁₂ N ₂ O	213	Imazalil	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O
183	Fenvalerate	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	214	Imazalil Metabolite	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O
184	Fluazifop	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄	215	Imazamethabenz-Methyl	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₃
185	Fipronil	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	216	Imazamox	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₄
186	Fluazifop-Butyl	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	217	Imazapyr	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃
187	Fluazinam	C ₁₃ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ O ₄	218	Imazaquin	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
188	Flucythrinate	C ₂₆ H ₂₃ F ₂ NO ₄	219	Imidacloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
189	Fludioxonil	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	220	Indoxacarb	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇
190	Flufenacet	C ₁₄ H ₁₃ F ₄ N ₃ O ₂ S	221	Ioxynil	C ₇ H ₃ l ₂ NO
191	Flufenoxuron	C ₂₁ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O ₃	222	Iprodione	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ Cl ₂ O ₃
192	Fluochloralin	C ₁₂ H ₁₃ ClF ₃ N ₃ O ₄	223	Iprovalicarb	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃
193	Fluomethuron	C ₁₀ H ₁₁ F ₃ N ₂ O	224	Isazophos	C ₉ H ₁₇ ClN ₃ O ₃ PS
194	Fluquinconazole	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	225	Isocarbophos	C ₁₁ H ₁₆ NO ₄ PS
195	Fluroxypyr	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃	226	Isofenphos	C ₁₅ H ₂₄ NO ₄ PS
196	Flusilazole	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	227	Isoproc carb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂
197	Flutolanil	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂	228	Isoprothiolane	C ₁₂ H ₁₈ O ₄ S ₂
198	Flutriafol	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	229	Isoproturon	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O
199	Fomesafen	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₆ S	230	Isoxaben	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₄
200	Forchlorfenuron	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₃ O	231	Isoxaflutole	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄ S
201	Formetanate	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₂	232	Karbutilate	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₃
202	Fosthiazate	C ₉ H ₁₈ NO ₃ PS ₂	233	Kresoxim Methyl	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄
203	Fuberidazol	C ₁₁ H ₈ N ₂ O	234	Lactofen	C ₁₉ H ₁₅ ClF ₃ NO ₇
204	Furalaxyl	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	235	Lenacil	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂
205	Furathiocarb	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S	236	Leptophos	C ₁₃ H ₁₀ BrCl ₂ O ₂ PS
206	Furmecyclox	C ₁₄ H ₂₁ NO ₃	237	Linuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂
207	Griseofulvin	C ₁₇ H ₁₇ ClO ₆	238	Lufenuron	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃
208	Haloxypop	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	239	Mecarbam	C ₁₀ H ₂₀ NO ₅ PS ₂
209	Hexaflumuron	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ F ₆ N ₂ O ₃	240	Mecoprop	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃
210	Hexazinone	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	241	Mefenacet	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S
211	Hexythiazox	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S	242	Mepanipyrim	C ₁₄ H ₁₃ N ₃
	<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>		<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>
243	Mephosfolam	C ₈ H ₁₆ NO ₃ PS ₂	274	N,N-Diethyl-2-	C ₁₇ H ₂₁ O ₂ N

				Naphtoloxypromide	
244	Mepiquat chloride isomer 1	C ₇ H ₁₆ N ⁺	275	Naptalam	C ₁₈ H ₁₃ NO ₃
245	Mepiquat chloride isomer 2	C ₇ H ₁₆ N ⁺	276	Neburon	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O
246	Mepronil	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂	277	Nitenpyram	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₄ O ₂
247	Mesotrion	C ₁₄ H ₁₃ NO ₇ S	278	N-Methylcarbamate	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
248	Metaflumizone	C ₂₄ H ₁₆ F ₆ N ₄ O ₂	279	Norflurazone	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O
249	Metalaxyl	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	280	Novaluron	C ₁₇ H ₉ ClF ₈ N ₂ O ₄
250	Metamitron	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	281	Nuarimol	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O
251	Metazachlor	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	282	Ofurace	C ₁₄ H ₁₆ ClNO ₃
252	Metazachlor	C ₉ H ₁₁ N	283	Omethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS
253	Methabenzthiazuron	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	284	Orbencarb	C ₁₂ H ₁₆ ClNOS
254	Methacrifos	C ₇ H ₁₃ O ₅ PS	285	Oryzalin	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₆ S
255	Methamidophos	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	286	Oxadiazon	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃
256	Methidathion	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	287	Oxadixyl	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄
257	Methiocarb Sulfoxide	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S	288	Oxamyl	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
258	Methomyl	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	289	Oxfendazole	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
259	Methoprotrene	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ OS	290	Oxyfluorfen	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄
260	Methoxyfenozide	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃	291	Paclobutrazol	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O
261	Metobromuron	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	292	Parathion	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS
262	Metolachlor	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	293	Parathion-Methyl	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS
263	Metolcarb	C ₉ H ₁₁ NO ₂	294	Paraaxon methyl	C ₈ H ₁₀ NO ₆ P
264	Metoxuron	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	295	Pebulat	C ₁₀ H ₂₁ NOS
265	Metribuzin	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	296	Penconazole	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃
266	Metsulfuron Methyl	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	297	Pencycuron	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O
267	Mevinphos	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	298	Pendimethalin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄
268	Miconazole Nitrate	C ₁₈ H ₁₄ Cl ₄ N ₂ O	299	Permethrin isomer 1	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃
269	Molinate	C ₉ H ₁₇ NOS	300	Permethrin isomer 2	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃
270	Monocrotophos	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	301	Phenmedipham	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄
271	Monolinuron	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	302	Phenothrin	C ₂₃ H ₂₆ O ₃
272	Monuron	C ₉ H ₁₁ ClON ₂	303	Phenthoate	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂
273	Myclobutanil	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	304	Phorate	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃
	<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>		<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>

305	Phosalone	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	336	Pymetrozin	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O
306	Phosphamidon	C ₁₀ H ₁₉ ClNO ₅ P	337	Pyracarbolid	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂
307	Phoxim	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	338	Pyraclostrobin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄
308	Picloram	C ₆ H ₃ Cl ₃ N ₂ O ₂	339	Pyranocoumarin	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
309	Picolinafen	C ₁₉ H ₁₂ F ₄ N ₂ O ₂	340	Pyridaben	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS
310	Piperonyl Butoxide	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	341	Pyridaphenthion	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS
311	Piperophos	C ₁₄ H ₂₈ NO ₃ PS ₂	342	PyrifenoX Isomero 1	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
312	Pirimicarb	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	343	PyrifenoX Isomero 2	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
313	Pirimiphos Methyl	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	344	Pyrimethanil	C ₁₂ H ₁₃ N ₃
314	Pretilachlor Isomer 1	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₂	345	Pyriproxifen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃
315	Pretilachlor Isomer 2	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₂	346	Pyroquilon	C ₁₁ H ₁₁ NO
316	Prochloraz	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	347	Quinalphos	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS
317	Procyimdone	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	348	Quinmerac	C ₁₁ H ₈ ClNO ₂
318	Profenofos	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	349	Quinoclamine	C ₁₀ H ₆ ClNO ₂
319	Promecarb	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	350	Quinoxifen	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO
320	Prometon	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	351	Quizalofop-P-Ethyl	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄
321	Prometryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	352	Rimsulfuron	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂
322	Propachlor	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	353	Rotenone	C ₂₃ H ₂₂ O ₆
323	Propamocarb	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	354	Secbumeton	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O
324	Propanil	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO	355	Sethoxydim	C ₁₇ H ₂₉ NO ₃ S
325	Propaquizafop	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	356	Siduron	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O
326	Propargite	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	357	Silafluofen	C ₂₅ H ₂₉ FO ₂ Si
327	Propazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	358	Simazine	C ₇ H ₁₂ ClN ₅
328	Propetamphos	C ₁₀ H ₂₀ NO ₄ PS	359	Spiromesifen	C ₂₃ H ₃₀ O ₄
329	Propiconazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	360	Spirotetramat	C ₂₁ H ₂₇ NO ₅
330	Propisochlor	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	361	Spiroxamine	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂
331	Propoxur	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	362	Spynosad (Spinosyn A)	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀
332	Propyzamid	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	363	Spynosad (Spinosyn D)	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀
333	Proquinazid	C ₁₄ H ₁₇ IN ₂ O ₂	364	Sulcotrione	C ₁₄ H ₁₃ ClO ₅ S
334	Prosulfocarb	C ₁₄ H ₂₁ NOS	365	Sulfometuron Methyl	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₅ S
335	Prosulfuron	C ₁₅ H ₁₆ F ₃ N ₅ O ₄ S	366	Sulfotep	C ₈ H ₂₀ O ₅ P ₂ S ₂
	<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>		<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>

367	Sulprofos	C ₁₂ H ₁₉ O ₂ PS ₃	392	Tolyfluand	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂
368	Tau-Fluvalinate	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	393	Tralkoxidym	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃
369	Tcpp	C ₉ H ₁₈ Cl ₃ O ₄ P	394	Transfluthrin	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ F ₄ O ₂
370	Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	395	Triadimefon	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂
371	Tebufenpyrad	C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O	396	Triadimenol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂
372	Tebutam	C ₁₅ H ₂₃ NO	397	Triallat	C ₁₀ H ₁₆ Cl ₃ NOS
373	Tebuthiuron	C ₉ H ₁₆ N ₄ OS	398	Triasulfuron	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₅ S
374	Teflubenzuron	C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂	399	Triazophos	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS
375	Tembotrione	C ₁₇ H ₁₆ ClF ₃ O ₆ S	400	Triazoxid	C ₁₀ H ₆ ClN ₅ O
376	Temephos	C ₁₆ H ₂₀ O ₆ P ₂ S ₃	401	Trichlorfon	C ₄ H ₆ Cl ₃ O ₄ P
377	Tepraloxymid	C ₁₇ H ₂₄ ClNO ₄	402	Triclocarban	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ ON ₂
378	Terbacil	C ₉ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	403	Tridemorph	C ₁₉ H ₃₉ NO
379	Terbumeton	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	404	Trietazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅
380	Terbutylazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	405	Trifloxystrobin	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄
381	Terbutryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	406	Trifloxysulfuron	C ₁₄ H ₁₃ F ₃ N ₅ O ₆ S
382	Tetrachovinphos	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ O ₄ P	407	Triflumizole	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O
383	Thiabendazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	408	Triflumuron	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃
384	Thiacloprid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	409	Trifluralin	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄
385	Thiamethoxam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	410	Triforine isomer 1	C ₁₀ H ₁₄ Cl ₆ N ₄ O ₂
386	Thidiazuron	C ₉ H ₈ N ₄ O ₅ S	411	Triforine isomer 2	C ₁₀ H ₁₄ Cl ₆ N ₄ O ₂
387	Thiocyclam	C ₅ H ₁₁ NS ₃	412	Trinexapac-Ethyl	C ₁₃ H ₁₆ O ₅
388	Thiodicarb	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃	413	Triticonazole	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O
389	Thiofanox	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₂ S	414	Vamidothion	C ₈ H ₁₈ NO ₄ PS ₂
390	Thiophanate Methyl	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	415	Xmc (3,5-Xylomethylcarbamate)	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂
391	Tolclofos Methyl	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS	416	Zoxamide	C ₁₄ H ₁₆ Cl ₃ NO ₂

- 5.2. Estudio de la degradación de plaguicidas empleados en el olivar mediante radiación ultravioleta e identificación de los principales productos de degradación en disoluciones acuosas y aceite de oliva virgen

Resumen

En este estudio, se ha examinado el comportamiento frente al tratamiento con radiación UV de los principales plaguicidas empleados en el olivar tanto en agua como en aceite de oliva (a excepción de la familia de las triazinas que por su importancia se tratan, en detalle, en el capítulo 5.3). Se han incluido un total de treinta y nueve plaguicidas (insecticidas y herbicidas) de uso intensivo en el olivar. La selección de estos plaguicidas se ha llevado a cabo considerando los resultados obtenidos en el capítulo 5.1, así como los compuestos incluidos en las diferentes normativas que establecen límites para la presencia de estos productos en aceite de oliva y aceitunas. Para el estudio de degradación se empleó un reactor de 0.5 L de volumen que operaba en modo discontinuo y que disponía de una lámpara de mercurio de media presión con 150 W de potencia. Los experimentos llevados a cabo incluían un periodo de exposición de 60 y 150 minutos para los ensayos con agua y aceite respectivamente. Para el seguimiento de la degradación de los plaguicidas, y según la naturaleza y propiedades físico-químicas de los plaguicidas estudiados, se hizo uso de cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo empleando como fuente de ionización electrospray (LC-TOFMS) o de cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). La adquisición de alícuotas a tiempos diferentes de exposición permitió calcular los parámetros de carácter cinético y confirmar que se trata de procesos con cinética de primer orden. De los 39 plaguicidas estudiados, en el caso de los ensayos en agua, un 87 % de los mismos presentaba un valor de vida media $t_{1/2}$ (tiempo necesario para la degradación del 50 % del producto) menor de 15 minutos. En el caso de los estudios en aceite de oliva, se encontró que un 61 % de los plaguicidas estudiados presentaba un $t_{1/2}$ menor de 60 minutos. Sólo en el caso de 5 plaguicidas se encontraron valores de $t_{1/2}$ superiores a 150 minutos (α -cipermetrin, α -endosulfan, endosulfan sulfate, β -endosulfan y diazinon).

Además de la monitorización de la degradación de los plaguicidas también se estudiaron e identificaron los principales productos de degradación (PDs) generados tanto en el ensayo en agua como en aceite. Para ello, se llevaron a cabo experimentos con LC-TOFMS, y empleando medidas de masas exactas de iones se obtuvieron las composiciones elementales tanto de las moléculas como de sus fragmentos característicos, lo que permitió la elucidación de la mayoría de los intermedios identificados. Más de 70 productos de degradación fueron identificados en los ensayos en agua. Muchos de ellos no estaban descritos anteriormente en la literatura. En algunos casos, tanto en los estudios en agua como en los estudios en aceite de oliva, se formaron productos de transformación con una abundancia relevante y que perduraron hasta el final del tratamiento. Esto ocurrió en el caso de los siguientes plaguicidas: carfentrazone-ethyl, difeconazole, fenitrothion, fenthion, norflurazone, oryzalin, oxyflourfen, parathion methyl, pirimphos methyl, propiconazole, tebuconazole y thiabendazole. Por este motivo, mediante el empleo de una herramienta *in silico* desarrollada por la US EPA (EE.UU) para la predicción de toxicidad de sustancias químicas, basadas en el empleo de relaciones estructura/actividad (*Qualitative Structure Activity Relationships*) llamada T.E.S.T, se pudo estimar la toxicidad de las especies más persistentes al tratamiento UV, siendo el fenitrothion PD1, quien presentó permanencia durante el tratamiento UV y una toxicidad de LD₅₀ 30.66 mg/L.

5.2.1. Introducción

La calidad del aceite de oliva depende de muchos factores en el proceso de producción del mismo, desde la recolección, hasta la producción de aceite de oliva en la almazara. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, para garantizar la calidad del aceite de oliva virgen, se requiere de un control estricto que permita establecer y detectar plaguicidas a niveles muy bajos (incluso por debajo de 1 nanogramo de plaguicida por gramo de aceite). En este sentido, en los próximos años, se establecerán normativas muy exigentes a nivel europeo en relación al establecimiento y armonización de los niveles máximos de plaguicidas que se van a permitir en productos elaborados como puede ser el aceite de oliva (no ecológico), a niveles tan exigentes como los que recientemente se han establecido para productos elaborados para bebés (10 µg/Kg). En cuanto al aceite de oliva ecológico, no será admisible la presencia de trazas de plaguicidas que habitualmente se detectan en la actualidad.

Una solución para evitar la pérdida de partidas de aceite de oliva que estén contaminadas por algún producto fitosanitario es el empleo de técnicas de degradación/oxidación de estos compuestos, de forma que deseablemente mediante procesos físicos que no involucren la adición de sustancias químicas se pueden eliminar estos residuos de plaguicidas, que de lo contrario podrían impedir la comercialización del producto final (si no cumplen los límites establecidos) y también pueden dañar la imagen y percepción de calidad del producto. Potenciales casos de falta de control y contaminación de plaguicidas en aceite de oliva podrían dañar de forma irreparable la imagen de producto saludable del aceite de oliva virgen español, provocando efectos económicos negativos para las regiones en las que el olivar sea la principal actividad económica. Por el contrario, un control de las prácticas agrícolas de producción junto con la tecnología más avanzada en materia de seguridad alimentaria puede contribuir a proporcionar valor añadido al producto frente a otros productores emergentes de aceite de oliva como China, EE.UU, Australia, Chile y Argentina.

La presente memoria doctoral está centrada en la evaluación del tratamiento con luz UV para la degradación y eliminación de estos plaguicidas, cuya presencia puede paralizar grandes partidas de aceite (ya sea destinado para uso alimentario, uso directo o para mezcla/refinado). Los antecedentes en el desarrollo de tecnologías de eliminación de plaguicidas en aceite de oliva son muy escasos. Una de las técnicas que se ha aplicado para la eliminación de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos es la degradación mediante tratamiento con radiación UV [254]. Hay que tener en cuenta que en el caso de aceite de oliva virgen, para que éste se considere como tal, no se le puede aplicar durante su producción ningún tratamiento químico que involucre la adición de sustancias químicas. Sólo para el caso de aceite de oliva destinado a refinado esto se podría implementar [236]. En un trabajo preliminar, Martínez y colaboradores [106] abordaron el estudio de viabilidad del uso de procesos de degradación con radiación UV en condiciones controladas de laboratorio para la eliminación de plaguicidas en aceite de oliva. El estudio se llevó a cabo con 5 plaguicidas comúnmente usados en el olivar (parathion-methyl, parathion, chlorpyrifos, oxifluorfen y methyl-chlorpyrifos). Estos estudios preliminares han mostrado que se trata de una aproximación muy prometedora para la eliminación de productos fitosanitarios en aceite de oliva, mediante la aplicación de un tratamiento físico, en unas condiciones suaves que no alteran los valores de los parámetros de calidad establecidos por los organismos. En estos estudios, y para una serie de plaguicidas comunes en el olivar, se obtuvieron unos porcentajes de eliminación de plaguicidas de hasta el 80 %.

En este estudio, se ha examinado el comportamiento frente al tratamiento con radiación UV de los principales plaguicidas empleados en el olivar tanto en agua como en aceite de oliva (a excepción de la familia de las triazinas que por su importancia se tratan, en detalle, en el capítulo 5.3). Se han incluido un total de treinta y nueve plaguicidas (insecticidas y herbicidas) de uso intensivo en el olivar. La selección de estos plaguicidas se ha llevado a cabo considerando los resultados obtenidos en el capítulo 5.1, así como los compuestos incluidos en las diferentes normativas que incluyen

límites para la presencia de estos productos en aceite de oliva y aceitunas. Para el estudio de degradación se empleó un reactor de 0.5 L de volumen que operaba en modo discontinuo y que disponía de una lámpara de mercurio de media presión con 150 W de potencia. Los experimentos llevados a cabo incluían un periodo de exposición de 60 y 150 minutos para los ensayos con agua y aceite respectivamente. Para el seguimiento de la degradación de los plaguicidas, y según la naturaleza y propiedades físico-químicas de los plaguicidas estudiados, se hizo uso de cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo empleando como fuente de ionización electrospray (LC-TOFMS) y cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). La adquisición de alícuotas a tiempos diferentes de exposición permitió estudiar la cinética de degradación para cada compuesto. Además de la monitorización de la degradación de los plaguicidas también se han estudiado los principales productos de degradación (PDs) con LC-TOFMS y empleando medidas de masas exactas de iones.

5.2.2. Experimental

5.2.2.1. Patrones

Los patrones de los plaguicidas estudiados se incluyen en la Tabla 5.2.1, y Tabla 5.2.2., y fueron adquiridos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania) y Riedel-de-Häen (Seelze, Alemania), con una pureza del 99% aproximadamente. Se emplearon disolventes de calidad HPLC (acetona, ciclohexano, metanol, diclorometano) de Panreac. El sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4) también se obtuvo de Panreac (Barcelona, España). Se prepararon disoluciones concentradas de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de cada plaguicida en hexano o acetato de etilo (para compuestos analizados por GC) o metanol (para compuestos analizados por LC) y se almacenaron en el congelador (-20°C). Se preparó una disolución mezcla de patrones a 1 mg/L de concentración.

Tabla 5.2.1. Lista de plaguicidas incluidos en el presente estudio de degradación mediante radiación UV que fueron estudiados mediante LC-TOFMS.

	<i>Compuesto</i>	<i>Composición elemental</i>	<i>Clasificación química</i>	<i>Tipo de compuesto</i>
1	Diflufenican	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	Anilina	Herbicidas
2	Propiconazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	Azole	Fungicidas
3	Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	Azole	Fungicidas
4	Difenoconazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	Azole	Fungicidas
5	Thiabendazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	Benzimidazol	Fungicidas
6	Carbaryl	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	Carbamatos	Insecticidas
7	Procymidone	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	Dicarboximida	Fungicidas
8	Kresoxin methyl	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	Estrobilurinas methoxyiminoacetate	Fungicidas
9	Trichorfon	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₅	Fosfato	Insecticidas
10	Pyriproxifen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	Insecticida biologico	Insecticidas
11	Fenoxycarb	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	Insecticida biologico	Insecticidas
12	Chlorpyrifos ethyl	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Organofosforados	Insecticidas
13	Chlorpyrifos metryl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	Organofosforados	Insecticidas
14	Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	Organofosforados	Insecticidas
15	Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	Organofosforados	Insecticidas
16	Fenitrothion	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	Organofosforados	Insecticidas
17	Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	Organofosforados	Insecticidas
18	Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	Organofosforados	Insecticidas
19	Methidathion	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	Organofosforados	Insecticidas
20	Parathion ethyl	C ₁₀ H ₁₄ O ₅ PS	Organofosforados	Insecticidas
21	Parathion methyl	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	Organofosforados	Insecticidas
22	Pirimyphos methyl	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	Organofosforados	Insecticidas
23	Phosalone	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	Organofosforados	Insecticidas
24	Phosmet	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	Organofosforados	Insecticidas
25	Buprofezin	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	Tiadiazina	Insecticidas
26	Pendimethalin	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₄	2,6-dinitroanilina	Herbicidas
27	Oryzalin	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₆ S	2,6-dinitroanilina	Herbicidas
28	Oxyflourfen	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	Difenileter	Herbicidas
29	Oxadiazon	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	Oxadiazolona	Herbicidas

	Compuesto	Composición elemental	Clasificación química	Tipo de compuesto
30	Norflurazone	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O	Piridazinona	Herbicidas
31	Amitrole	C ₂ H ₄ N ₄	Triazole	Herbicidas
32	Carfentazone-ethyl	C ₁₅ H ₁₄ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₃	Triazolona	Herbicidas
33	Chlorotoluron	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	Urea	Herbicidas
34	Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	Urea	Herbicidas

Tabla 5.2.2. Lista de plaguicidas incluidos en el presente estudio de degradación mediante radiación UV que fueron estudiados mediante GC-MS/MS.

	Compuesto	Composición elemental	Clasificación química	Tipo de compuesto
1	α -endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Organoclorado	Insecticidas
2	β -endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Organoclorado	Insecticidas
3	Endosulfan sulfate	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	Organoclorado	Insecticidas
4	Deltametrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	Piretroide	Insecticidas
5	α -cypermethrin	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	Piretroide	Insecticidas

5.2.2.2. Equipo para radiación ultravioleta

Los experimentos se realizaron en un fotorreactor integrado (ver Figura 5.2.1), descrito en detalle el aparato de instrumentación, con una lámpara UV inmersa en el tanque reactor donde se incorporaba 500 mL de la disolución. Se empleó un termómetro en el interior del reactor para controlar la temperatura del reactor durante la exposición UV.

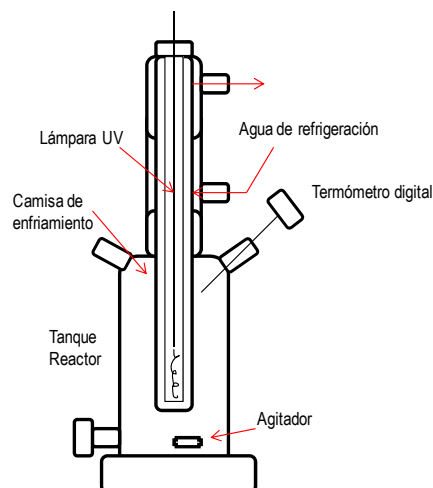


Figura 5.2.1. Montaje del equipo empleado para llevar a cabo los estudios de degradación UV.

5.2.2.3. Cromatografía de gases – espectrometría de masas

La determinación se realizó en un cromatógrafo de gases (Varian CP-3800), descrito en el apartado de instrumentación. La separación de los analitos se lleva a cabo utilizando una columna capilar Varian Factor Four VF-5-ms (30m x 0.25mm i.d. x 0.25 μ m) y He como gas portador a un flujo de 1.0 mL/min. La rampa de temperatura utilizada comienza a 70°C durante 2 minutos, después sube hasta 180°C a una velocidad de 10°C/min, a continuación alcanza los 260°C a 6°C/min y por último se llega a 300°C a una velocidad de 4°C/min, para un tiempo total de análisis de 43 minutos. El cromatógrafo de gases empleaba como detector un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Varian 300-MS). Las temperaturas de la línea de transferencia, fuente de iones y manifold seleccionadas fueron 280°, 250° y 40°C, respectivamente. Se establece un tiempo de retardo para el encendido del detector de 6.4 minutos para evitar la saturación y deterioro del mismo. Se empleó Ar como gas de colisión, para inducir la fragmentación de los compuestos utilizados. El método fue desarrollado en modo de monitorización de múltiples transmisiones (MRM), que requería de una optimización

previa de las condiciones de fragmentación para cada analito. Para el control del equipo, adquisición y evaluación de los resultados se utilizó el software Varian MS Workstation (versión 6.9).

5.2.2.4. Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo

La LC-TOFMS, nos permitió llevar a cabo medidas de masas exactas de iones de interés, para confirmar los compuestos detectados y proponer fórmulas moleculares para los diferentes productos de degradación, aún en ausencia de estándares o biblioteca de espectros. Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos HPLC (Agilent Series 1290, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), conectado con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent TOF 6220 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI) trabajando en modo de ionización positivo, excepto para el caso de los productos de degradación del carbaryl que se usó en modo negativo. En la Tabla 5.2.3., se presenta las condiciones cromatográficas utilizadas del LC-TOFMS.

El método cromatográfico empleado consistió en un gradiente de elución con agua con 0.1% de ácido fórmico como disolvente A y acetonitrilo (de calidad LC-MS) como disolvente B. El método empezaba con un 10% de B, que se mantenía constante durante 1 min, luego subía a 70% B en 3 minutos, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B en 10 minutos, donde se mantiene constante. Para el carbaryl, propiconazole y thiabendazole, se utilizó otra cromatografía más larga para poder observar mejor los compuestos más polares, que fue la siguiente, empezaba con un 10% de B, que se mantiene durante 4 min, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B en 12 minutos, donde se mantiene constante. Para poder observar mejor el pico del carbaryl se utilizó un voltaje de fragmentación de 160V; para el resto de plaguicidas: 190V. Se incluyó una etapa final de equilibrado de columna de 5 minutos después de cada análisis.

Tabla 5.2.3. Condiciones cromatográficas seleccionadas.

<i>Condiciones de la Cromatografía Líquida</i>	
Columna	Columna analítica C18 de 50 mm × 4.6 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C18)
Flujo	0.5 mL/min
Volumen de inyección	2.0 µL
<i>Condiciones del TOFMS</i>	
Voltaje del capilar	4000 V
Gas de secado	9 L/min
Temperatura del gas	325 °C
Presión del nebulizador	40 psi
Voltaje del fragmentador	190 V
Rango de m/z	50-1000 Da

5.2.2.5. Degradación de plaguicidas en disoluciones acuosas mediante radiación ultravioleta

En la realización de los estudios de degradación se llevaron a cabo estas etapas:

A. Experimentación UV y preparación de alícuotas para análisis de plaguicidas

El trabajo se centró en el análisis de la degradación e identificación de un grupo de 39 contaminantes orgánicos, representativos de diferentes familias de sustancias químicas, como insecticidas, herbicidas, fungicidas, así como la determinación de sus principales PDs. Para llevar a cabo el análisis de los plaguicidas, se aplicaron dos procedimientos distintos: inyección directa mediante LC-TOFMS y extracción líquido – líquido seguido de GC-MS/MS.

Se prepararon disoluciones de agua Milli-Q con los plaguicidas estudiados para someterlas a irradiación. Los experimentos de degradación, se realizaron a una temperatura de 27 ± 1 °C. Se tomaban 10 alícuotas del reactor para monitorizar el proceso. Éstas alícuotas (de 200 µL o 1000 µL según el tipo de experimento) se extrajeron del reactor a tiempo 0 (antes de la exposición) y una vez iniciado el experimento, se tomaban cada 5 minutos hasta los 30 minutos y a partir de entonces,

cada 10 minutos para el resto de experimento. De esta forma, el volumen extraído era prácticamente despreciable frente al total del crudo de reacción (500 mL). Se seguían los siguientes procedimientos dependiendo el tipo de técnica de análisis.

- Para GC-MS/MS, se extraen las alícuotas de 1 mL, en un tubo roscado de 5 ml, se añaden 1 mL de n-hexano y 0.025 g NaCl y se agitan vigorosamente durante 3 minutos. Se separan las fases para extraer el sobrenadante (n-hexano + plaguicidas) y secar con Na_2SO_4 anhidro, extraer 500 μL y llevar a analizar, según las condiciones descritas.
- Para LC - TOFMS, se extraían las alícuotas de 200 μL que se diluían con 800 μL de agua Mili-Q, para llevar a cabo el análisis cromatográfico, según las condiciones descritas.

En la Figura 5.2.2., se muestra el esquema seguido para la extracción de muestras previo a los análisis cromatográficos descritos.

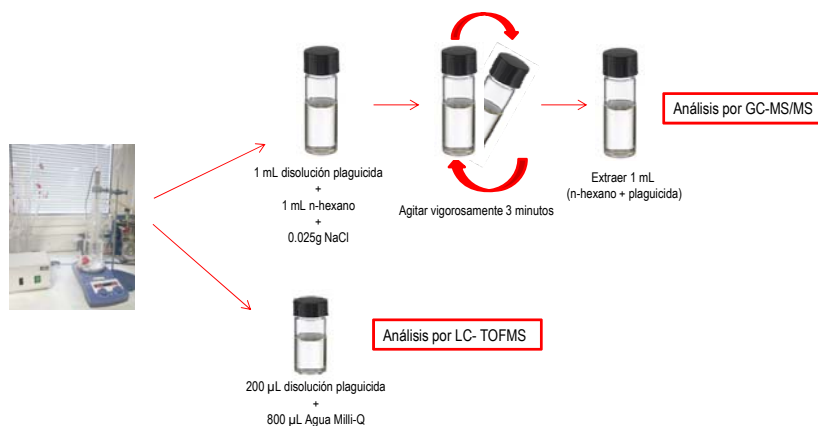


Figura 5.2.2. Esquema del procedimiento de extracción previo al análisis de plaguicidas por GC-MS/MS y LC-TOFMS.

B. Evaluación analítica de los procesos de degradación e identificación de productos de degradación

Se procedió al estudio de la degradación del plaguicida de partida, y también la identificación de los principales productos de degradación (PDs) y su evolución con el tiempo. Para estudiar la degradación de los plaguicidas, se empleaban los EICs, correspondientes a la molécula protonada ($[M+H]^+$) de la especie estudiada en LC-TOFMS o al ion producto empleado para cuantificar en GC-MS/MS. Esta operación se llevaba a cabo para los distintos tiempos de exposición y los picos de cada uno de los EICs eran integrados, y su área representada frente al tiempo de exposición, tanto para GC-MS/MS y LC-TOFMS. Sólo para los plaguicidas analizados por LC-TOFMS se identificaron y evaluaron los productos de degradación generados en el proceso de fotólisis por radiación UV, esta tarea se realizó con la ayuda del programa *Mass Hunter Qualitative Analysis*. Con el programa informático, se realizó la búsqueda de iones desconocidos, empleando la herramienta *Molecular Feature Extraction*. Ésta herramienta proporciona una lista con todos los compuestos detectados en el análisis mediante LC-TOFMS (sus valores de m/z , t_R y composición elemental más probable) de forma completamente automatizada. Los posibles compuestos que por su masa/carga y composición elemental son candidatos a ser PDs, se estudian a distintos tiempos de exposición, de forma que si se trata de un producto de degradación, este producto no debe ser detectado a tiempo 0. Una vez se confirma que el PDs no está presente a tiempo 0, se obtiene su EIC (con 20 mDa de ventana de masa) para los distintos tiempos de exposición, y el área de pico obtenida de integrar el cromatograma EIC se representa frente al tiempo de exposición.

Además de esta búsqueda automática, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica detallada de los posibles PDs de los compuestos estudiados [110, 255, 256], descritos por otros investigadores. La identificación de los compuestos desconocidos se realizó, mediante el estudio de las composiciones elementales tanto de la molécula intacta, como de los distintos fragmentos que aparecen en los espectros de masas. La obtención de composiciones elementales se consigue debido a la elevada resolución de masas proporcionada por el uso de un analizador de tiempo de vuelo [142, 143]. En la

Figura 5.2.3. se muestra de forma resumida el esquema de trabajo seguido para la investigación de productos de degradación de plaguicidas utilizados en el olivar en disoluciones acuosas.

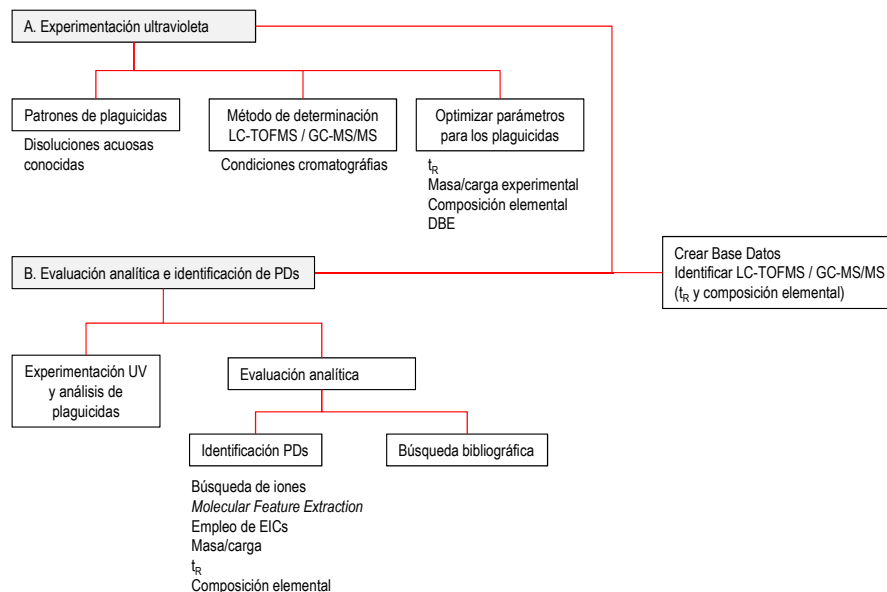


Figura 5.2.3. Esquema de trabajo empleado para el estudio de la degradación mediante UV de los plaguicidas y contaminantes orgánicos en estudio.

5.2.2.6. Degradación de plaguicidas en aceite de oliva virgen mediante radiación ultravioleta

Para la realización de los estudios de degradación en aceite de oliva virgen, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

que se pueden dar en los aceites comerciales. En el matraz se colocaban 500 mL de aceite de oliva. A continuación, se le añade el volumen mínimo necesario de la disolución patrón que contenía los 39 plaguicidas estudiados (para llegar a 0.20 ó 5 mg/Kg). Después la mezcla se agita durante una hora para su homogeneización.

Transcurrido ese tiempo, se dejó a temperatura ambiente durante una hora más para facilitar la evaporación del disolvente. Para realizar el estudio de degradación de los plaguicidas, se tomaron 7 porciones de 3 g del aceite estudiado a diferentes tiempos de radiación ultravioleta (0, 10, 30, 90, 120 y 150 minutos).

A. Preparación de la muestra de aceite de oliva virgen para el análisis

Se llevó a cabo el método QuEChERS modificado para matrices vegetales [124, 217] con alto contenido graso. En primer lugar se pesa una porción representativa de la muestra de 3 g en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL de capacidad, junto con 7 mL de agua ultrapura. A continuación, se añaden 10 mL de acetonitrilo (MeCN) y el tubo se agita manualmente durante 1 minuto. Después se añaden 4 g de sulfato de magnesio anhidro y 1 g de cloruro sódico (NaCl). Inmediatamente después (para evitar la coagulación del sulfato de magnesio anhidro) el tubo se agita de nuevo enérgicamente durante 1 minuto y posteriormente la mezcla se centrifugó a 3700 revoluciones por minuto (rpm) durante otro minuto. Una vez separadas las fases, se tomaron 5 mL del sobrenadante (extracto de acetonitrilo) y se transfieren a un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL de capacidad, al que se habían añadido previamente 750 mg de MgSO_4 , 250 mg de PSA y 250 mg de C18. El segundo tubo fue agitado durante 30 s y después se centrifugó a 3700 rpm durante 1 min. Un volumen de 3 mL de dicho extracto fue evaporado en un tubo de ensayo de vidrio (para GC-MS/MS se secó la muestra con Na_2SO_4), hasta casi sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.2 mL de metanol (MeOH) y 0.8 mL de agua ultrapura (milli Q), o en 0.5 mL de acetato de etilo y 1 mL de hexano para la determinación mediante LC-TOFMS y GC-MS respectivamente. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y transferido a un vial para su análisis. Para GC-MS/MS se diluyó el extracto 1:10. En la Figura 5.2.4., se puede ver un esquema de este procedimiento.

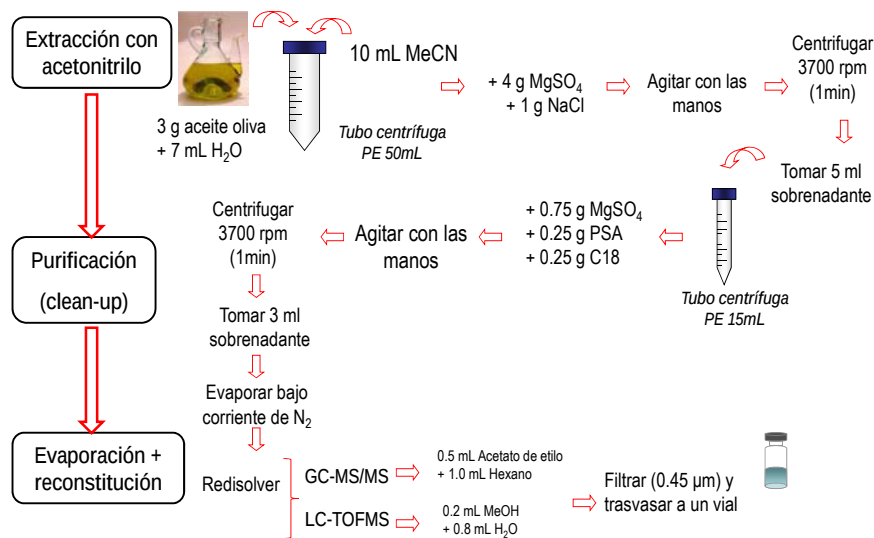


Figura 5.2.4. Esquema del protocolo QuEChERS utilizado para obtener los extractos de aceite para análisis por GC-MS/MS y LC-TOFMS.

C. Evaluación analítica de procesos de degradación e identificación de productos de degradación

El procedimiento de análisis de los experimentos de degradación, se realizó con la información obtenida mediante los análisis llevados a cabo con LC-TOFMS y GC-MS/MS. Se procedió estudiando de forma sistemática:

- La degradación del plaguicida de partida
- La identificación de productos de degradación (PDs) y su evolución con el tiempo

Se realizó el estudio según lo descrito en el apartado 5.2.2.5.

5.2.2.7. Predicción de toxicidad

Durante los procesos de degradación de los plaguicidas pueden originarse un gran número de PDs [257]. Estos PDs generados, pueden ser más resistentes a la degradación [137], y presentar igual o incluso mayor toxicidad que los compuestos

originales y su elevado número puede ser causante de efectos de potenciación de la toxicidad [258]. Por este motivo, se ha incluido un estudio *in silico* (*simulación por computadora*) de la toxicológica de estos PDs generados durante la exposición ultravioleta. Para la estimación de la toxicidad se utilizó la estructura molecular del PDs, que permite predecir la toxicidad mediante el uso de varias metodologías basadas en relación estructura – actividad (*Quantitative Structure Activity Relationships*, QSAR).

Para la realización de la estimación de la toxicidad de cada PDs, se utilizó el *Toxicity Estimation Software Tool* (T.E.S.T.), que es un programa informático de la Agencia de Protección Ambiental (*United States Environmental Protection Agency*, EPA) [259], que se encuentra disponible en internet, y consiste en un sistema computarizado de predicción que relaciona la estructura con la actividad del compuesto mediante modelos matemáticos (véase la ecuación 5.2.1.). Este programa informático tiene una variedad de parámetros usados para predecir la toxicidad, incluyendo propiedades tales como el coeficiente de partición octanol:agua, el peso molecular o el número de anillos de benceno.

$$\text{Toxicidad} = ax_1 + bx_2 + c \quad (\text{Ecuación 5.2.1.})$$

X_1 y X_2 son variables independientes
 a , b , y c son parámetros de ajuste

5.2.3. Resultados y discusión

5.2.3.1. Optimización de la separación cromatográfica

Los primeros experimentos realizados en este estudio se centraron en la optimización de la separación cromatográfica de los plaguicidas investigados. Para ello, en estas primeras pruebas se inyectaron alícuotas de 2 μ L de patrones individuales y de mezclas de los mismos para así poder identificar todos los compuestos mediante sus t_R . En el método cromatográfico LC-TOFMS, se ha elegido como voltaje de fragmentación en la fuente 190 V, como valor óptimo para la sensibilidad de la molécula protonada (utilizada para la cuantificación de los analitos) e información adicional proporcionada por los fragmentos a efectos de confirmación. Usando 190 V, al menos un fragmento podía ser usado para la confirmación de los compuestos, excepto para amitrole, diflufenican, oxyflourfen, pirimiphos methyl, procymidone y tebuconazole, para los que no se observó una fragmentación significativa. Para casi todos los plaguicidas estudiados el ion más abundante era la molécula protonada.

Las medidas de masa exacta se llevaron a cabo según el siguiente procedimiento. A partir del TIC se extrae la relación masa-carga (m/z) teórica de cada analito con una ventana de masa de 20 mDa, de este modo se obtiene el EIC. A efectos de confirmación se utilizaron los fragmentos de cada compuesto. En la Tabla 5.2.4. se muestran los resultados obtenidos para la identificación y confirmación de los treinta cuatro plaguicidas analizados a un nivel de concentración de 5 mg/Kg. Como se puede observar, la exactitud de masa es excelente, con errores inferiores a 2 ppm (error de masa relativo) para la mayoría de los casos. En resumen, las medidas de masa exacta de la molécula protonada junto con los fragmentos característicos y el t_R , permiten la identificación y confirmación de los plaguicidas estudiados a bajos niveles de concentración.

Tabla 5.2.4. Identificación de los plaguicidas estudiados en aceite de oliva virgen mediante LC-TOFMS, incluyendo las masas exactas de las moléculas protonadas y los principales fragmentos, a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

	Compuesto	t_R	ion	Composición elemental	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE
1	Amitrole	0.929	$[M+H]^+$	$C_2H_4N_4$	85.0509	85.0514	-	-
2	Buprofezin	8.533	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{23}N_3OS$	306.1659	306.1635	0.40	7
			Frg 1	$C_{14}H_{16}N_6O_2$	301.1414	301.1415	1.96	10
			Frg 2	$C_{12}H_{15}N_3OS$	250.1006	250.1009	0.97	7
			Frg 3	$C_9H_{16}N_2OS$	201.1055	201.1056	0.71	3
			Frg 4	$C_8H_4O_3$	149.0236	149.0233	2.07	7
			Frg 5	C_5H_9NS	116.0527	116.0528	0.87	2
3	Carbaryl *	8.474	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{11}NO_2$	202.0863	202.0860	1.42	8
			Frg 1	$C_{10}H_6N_2$	155.0604	155.0600	2.13	9
			Frg 2	$C_{10}H_8O$	145.0648	145.0647	0.96	7
			Frg 3	C_7H_6O	107.0491	107.049	1.14	5
4	Carfentazone ethyl	7.280	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{14}Cl_2F_3N_3O_3$	412.0437	412.0439	0.42	8
			Frg 1	$C_{13}H_{10}Cl_2F_3N_3O_3$	384.0124	384.0124	0.15	8
			Frg 2	$C_{13}H_8Cl_2F_3N_3O_2$	366.0017	366.0007	0.59	9
			Frg 3	$C_{14}H_{22}N_2$	219.1856	219.1856	0.06	5
5	Chlorpyrifos ethyl	9.120	$[M+H]^+$	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	349.9336	349.9336	0.50	4
			Frg 1	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	321.9014	321.9023	2.20	4
			Frg 2	$C_4HCl_3NO_6P$	295.8681	295.868	0.26	4
			Frg 3	$C_4H_2Cl_2NO_2P$	197.9271	197.9273	0.76	4
6	Chlorpyrifos methyl	6.210	$[M+H]^+$	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	321.9023	321.9014	0.65	4
7	Chlorotoluron	5.807	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{13}ClN_2O$	213.0789	213.0789	0.43	5
			Frg 1	C_8H_6ClNO	168.0207	168.0211	1.97	6
			Frg 2	C_7H_6O	107.0492	107.0491	0.44	5
			Frg 3	C_3H_5NO	72.0448	72.0447	1.20	2
8	Diazinon	8.001	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	305.1083	305.1083	0.50	5
			Frg 1	$C_8H_{12}N_2S$	169.0791	169.0794	1.57	4
			Frg 2	$C_8H_{12}N_2O$	153.1019	153.1022	2.03	4
9	Difeconazole	7.568	$[M+H]^+$	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	406.072	406.072	0.56	12
			Frg 1	$C_{13}H_8Cl_2O$	251.0021	251.0025	1.49	9
10	Diflufenican	8.163	$[M+H]^+$	$C_{19}H_{11}F_5N_2O_2$	395.0813	395.0813	0.21	13
11	Dimethoate	5.208	$[M+H]^+$	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	230.0069	230.0066	0.08	1
			Frg 1	$C_4H_7O_3PS_2$	198.9646	198.9647	0.40	2
			Frg 2	$C_3H_7O_2PS_2$	170.9697	170.9698	0.65	1
			Frg 3	$C_4H_2N_2O_2S$	142.9924	142.9923	1.93	5
			Frg 4	C_3H_5NS	88.0219	88.0218	1.99	2
12	Diuron	6.040	$[M+H]^+$	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	233.0249	233.0244	0.37	5
			Frg 1	$C_{12}H_{19}NO$	194.1539	194.1539	0.48	4
			Frg 2	C_3H_5NO	72.0450	72.0449	1.14	2
13	Fenitrothion	7.015	$[M+H]^+$	$C_9H_{12}NO_5PS$	278.0247	278.0247	1.19	5
			Frg 1	$C_8H_8NO_4PS$	245.9977	245.9975	2.21	6

	Compuesto	t_R	ion	Composición elemental	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE
14	Fenoxycarb	5.089	$[M+H]^+$	$C_{17}H_{19}NO_4$	302.1387	302.1387	0.73	9
			Frg 1	$C_{15}H_{13}NO_3$	256.097	256.0968	0.62	10
			Frg 2	$C_5H_9NO_2$	116.0706	116.0706	0.34	2
			Frg 3	$C_3H_5NO_2$	88.0397	88.0398	1.09	2
15	Fenthion	7.625	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	279.0273	279.0273	1.02	4
			Frg 1	$C_9H_{11}O_2PS_2$	247.0011	247.001	0.16	5
			Frg 2	$C_8H_8S_2$	169.014	169.014	0.17	5
16	Kresoxin methyl	7.784	$[M+H]^+$	$C_{18}H_{19}NO_4$	314.1387	314.1387	0.81	10
			Frg 1	$C_{17}H_{15}NO_3$	282.1125	282.1125	0.08	11
			Frg 2	$C_{17}H_{14}O_3$	267.1017	267.1016	0.59	11
			Frg 3	$C_{16}H_{15}NO_2$	254.118	254.1176	1.57	10
			Frg 4	$C_{16}H_{15}NO$	238.1227	238.1226	0.08	10
			Frg 5	$C_{11}H_{11}NO_3$	206.0812	206.0812	0.14	7
			Frg 6	$C_{10}H_{11}NO$	162.0913	162.0913	0.16	6
17	Malathion	7.106	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	331.0433	331.0431	0.66	2
			Frg 1	$C_8H_{13}O_5PS_2$	285.0014	285.0015	0.26	3
			Frg 2	$C_7H_{13}O_4PS_2$	257.0064	257.0066	0.54	2
			Frg 3	$C_5H_7O_3PS_2$	210.9648	210.9647	0.63	3
			Frg 4	$C_6H_6O_3$	127.039	127.039	0.07	4
18	Methidathion	4.725	$[M+H]^+$	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	302.9691	302.9691	0.19	3
19	Norflurazone	6.028	$[M+H]^+$	$C_{12}H_9ClF_3N_3O$	304.0459	304.0459	0.50	8
			Frg 1	$C_{11}H_{13}FN_2O_6$	289.0834	289.083	1.07	6
20	Oryzalin	6.957	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{18}NaO_6S$	347.102	347.102	0.35	6
			Frg 1	$C_9H_{12}NaO_6S$	305.0545	305.055	1.60	6
21	Oxadiazon	9.055	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_3$	345.0767	345.0764	0.88	7
			Frg 1	$C_{12}H_{12}Cl_2N_2O_3$	303.0292	303.0298	1.15	7
			Frg 2	$C_9H_{18}N_6O$	227.1619	227.1615	1.67	4
			Frg 3	$C_6H_{19}N$	226.1594	226.159	1.43	8
22	Oxyflourfen	8.501	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$	362.0401	362.0401	0.03	9
23	Parathion ethyl	7.463	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{14}O_5PS$	292.0403	292.0405	0.64	5
			Frg 1	$C_8H_{10}NO_5PS$	264.0087	264.009	1.06	5
			Frg 2	$C_6H_6NO_5PS$	235.9775	235.9777	0.83	5
			Frg 3	$C_8H_{24}N_5P$	222.1831	222.1832	1.01	0
			Frg 4	$C_{12}H_{25}NO$	200.2009	200.2009	0.28	1
24	Parathion methyl	4.876	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	292.0403	292.0396	2.28	5
25	Pendimethalin**	9.097	$[M+H]^+$	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	282.1448	282.1449	0.12	6
			Frg 1	$C_{18}H_{24}O$	257.189	257.1896	1.38	6
			Frg 2	$C_{14}H_{29}NO$	228.2322	228.2319	1.26	1
			Frg 3	$C_8H_9N_3O_4$	212.0666	212.0665	0.46	6
26	Phosalone	8.014	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$	367.9941	367.9936	1.39	6
			Frg 1	$C_8H_4ClNO_2$	182.0004	182.0003	0.28	7
			Frg 2	C_7H_4ClN	138.0107	138.0105	1.54	6
27	Phosmet	8.572	$[M+H]^+$	$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	318.0018	318.0010	1.60	7
			Frg 1	$C_9H_6NO_2$	160.0393	160.0394	0.43	8

	Compuesto	t_R	ion	Composición elemental	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE
28	Pirimyphos methyl	8.046	$[M+H]^+$	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	306.1036	306.1035	0.13	4
29	Procymidone	7.219	$[M+H]^+$	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	284.024	284.024	0.43	8
30	Propiconazole**	9.875	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	342.0771	342.0773	0.69	8
			Frg 1	$C_7H_4Cl_2$	158.9763	158.9763	0.14	5
31	Pyriproxifen	9.009	$[M+H]^+$	$C_{20}H_{19}NO_3$	322.1438	322.1438	0.97	20
			Frg 1	$C_{15}H_{14}O_2$	227.1067	227.1067	0.28	9
			Frg 2	$C_{12}H_8O_2$	185.0595	185.0597	0.54	9
			Frg 3	C_5H_5NO	96.0447	96.0446	1.18	4
32	Tebuconazole	6.939	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	308.1524	308.1527	0.82	7
33	Thiabendazole**	4.380	$[M+H]^+$	$C_{10}H_7N_3S$	202.0433	202.0438	2.09	9
			Frg 1	$C_9H_6N_2S$	175.0327	175.0324	1.67	8
34	Triclorfon	3.241	$[M+H]^+$	$C_4H_8Cl_3O_4P$	256.9299	256.9303	1.86	0
			Frg 1	$C_4H_7Cl_2O_4P$	220.9532	220.9537	1.98	1

$[M+H]^+$: Molécula protonada

Error: diferencia entre m/z experimental y m/z teórica (de la composición elemental asignada)

* Compuesto detectado a 160V, Método largo

** Método largo

Los parámetros empleados para la identificación de los plaguicidas que se determinaron mediante GC-MS/MS se muestran en la Tabla 5.2.5.

Tabla 5.2.5. Tiempos de retención, composición elemental, ion precursor e iones producto de los plaguicidas estudiados por GC-MS/MS.

	Compuesto	t_R (min)	Composición elemental	Ion precursor m/z	Iones producto (m/z)		
					m/z	m/z	m/z
1	α -cypermethrin	35.01	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	163.0	90.9	126.9	152.1
2	α -endosulfan	24.98	$C_9H_6Cl_6O_3S$	338.8	160.1	194.9	230.9
3	β -endosulfan	27.20	$C_9H_6Cl_6O_3S$	338.8	266.7	160.0	230.8
4	Deltamethrin	38.38	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	252.9	93.0	174.0	90.9
5	Endosulfan sulfate	28.53	$C_9H_6Cl_6O_4S$	386.8	252.9	288.9	205.7

5.2.3.2. Estudio de degradación de los plaguicidas en disoluciones acuosas

La facilidad de degradación de un plaguicida depende de su estructura molecular. Ésta desempeña un papel muy importante determinando su comportamiento en función de su capacidad de absorción de la radiación solar [260]. Para estudiar la degradación de los plaguicidas, se llevaron a cabo una serie de experimentos, exponiendo las disoluciones de las plaguicidas en agua Milli-Q a la radiación UV durante 60 minutos, tomando muestras a distintos intervalos de tiempo para cada experimento, para su posterior análisis mediante LC-TOFMS. La Tabla 5.2.6. muestra los valores promedio obtenidos en porcentaje de degradación de los plaguicidas estudiados.

Tabla 5.2.6. Degradación de los plaguicidas estudiados en porcentaje, según el tiempo de exposición UV (minutos) en disoluciones acuosas, promedio.

	Compuesto	Tiempo de exposición (minutos)								
		0	5	10	20	25	30	40	50	60
1	Amitrole	0.00	16.67	32.34	48.76	56.40	65.11	67.88	75.48	81.57
2	Buprofezin	0.00	29.70	86.43	97.60	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
3	Carbaryl	0.00	70.12	95.51	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
4	Carfentrazone-ethyl	0.00	53.22	82.07	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	Chlorotoluron	0.00	76.22	96.62	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
6	Chlorpyrifos ethyl	0.00	37.41	77.00	97.47	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	Chlorpyrifos methyl	0.00	36.63	56.57	80.58	85.04	89.13	93.81	96.09	97.97
8	Deltametrin	0.00	10.16	36.44	64.45	73.12	82.81	89.18	94.90	98.01
9	Diazinon	0.00	38.14	82.19	98.52	99.56	99.85	99.98	99.98	100.00
10	Difeconazole	0.00	72.51	95.01	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
11	Diffufenican	0.00	3.23	16.26	29.73	38.27	47.91	51.13	58.96	65.56
12	Dimethoate	0.00	57.81	82.23	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
13	Diuron	0.00	85.35	96.93	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
14	Endosulfan sulfate	0.00	2.48	17.54	59.59	66.73	76.59	87.10	92.42	95.05
15	Fenitrothion	0.00	50.64	82.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
16	Fenoxycarb	0.00	87.73	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
17	Fenthion	0.00	88.62	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

18	Kresoxin methyl	0.00	86.80	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
19	Malathion	0.00	58.80	87.66	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
20	Methidathion	0.00	83.96	95.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
21	Norflurazone	0.00	0.00	15.09	37.31	47.96	55.65	70.26	79.30	85.58
22	Oryzalin	0.00	14.90	45.09	74.35	82.24	90.48	96.25	98.56	100.00
23	Oxadiazon	0.00	79.77	95.52	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
24	Oxyflourfen	0.00	17.26	51.70	77.79	85.78	89.98	94.79	100.00	100.00
25	Parathion ethyl	0.00	72.18	95.41	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
26	Parathion methyl	0.00	32.22	43.43	59.02	67.34	70.69	78.32	85.92	89.09
27	Pendimethalin	0.00	12.60	31.03	39.12	54.92	64.62	75.92	83.95	90.01
28	Phosalone	0.00	88.73	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
29	Phosmet	0.00	86.03	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
30	Pirimyphos	0.00	88.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
31	Procymidone	0.00	85.23	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
32	Propiconazole	0.00	82.05	94.86	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
33	Pyriproxifen	0.00	68.97	94.77	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
34	Tebuconazole	0.00	68.66	91.70	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
35	Thiabendazole	0.00	7.56	22.86	59.77	68.79	77.03	88.29	93.43	97.04
36	Trichlorfon	0.00	45.42	81.07	98.16	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
37	α -cypermethrin	0.00	25.26	48.61	69.69	79.01	85.87	94.36	97.76	100.00
38	α -endosulfan	0.00	4.92	21.09	41.75	51.04	65.62	76.56	83.36	89.31
39	β -endosulfan	0.00	10.52	22.73	53.64	63.42	73.82	84.66	90.63	95.37

De los treinta nueve compuestos investigados, aproximadamente el 72% de estos compuestos se degradaron completamente al término de los 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta. Los que presentaron una rápida degradación antes de los 10 minutos fueron el fenoxycarb, fenthion, kresoxim methyl, phosalone, phosmet, pirimyphos methyl y procymidone. Por otra parte, tal como podemos observar en la Figura 5.2.5., amitrole, diflufenican, norflurazone, oryzalin, pendimethalin y thiabendazole presentaron resistencia a la luz UV. En este sentido los organoclorados (α -endosulfan, β -endosulfan y endosulfan sulfate) fueron los que presentaron mayor resistencia a la degradación. Por

último, la degradación del diflufenican, fue muy lenta, coincidiendo con los resultados obtenidos de este compuesto en suelos [261, 262].

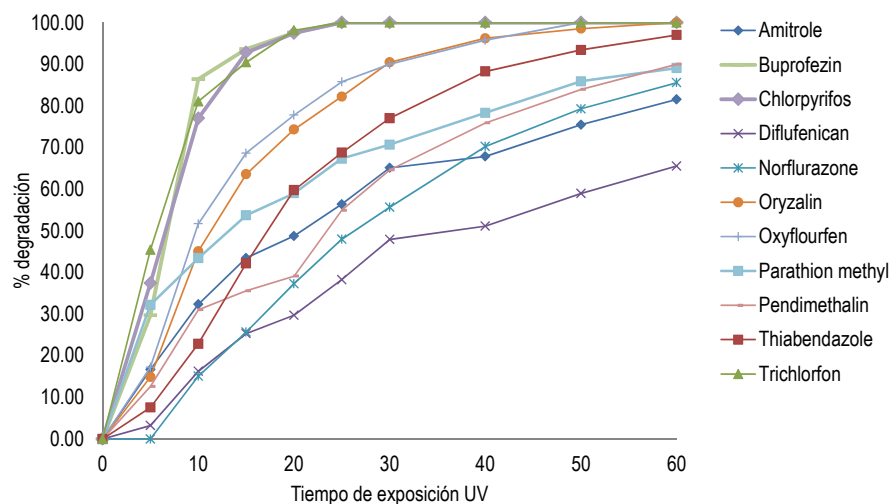


Figura 5.2.5. Curvas de degradación de los plaguicidas estudiados más resistentes a la luz UV, en disoluciones acuosas.

Como ejemplo de los experimentos llevados a cabo, en la Figura 5.2.6, se muestran los EIC superpuestos obtenidos durante la exposición a radiación UV correspondientes a 0, 5, 10, 15 y 20 min. Se puede observar claramente el descenso de los plaguicidas en estudio debido a la luz UV.

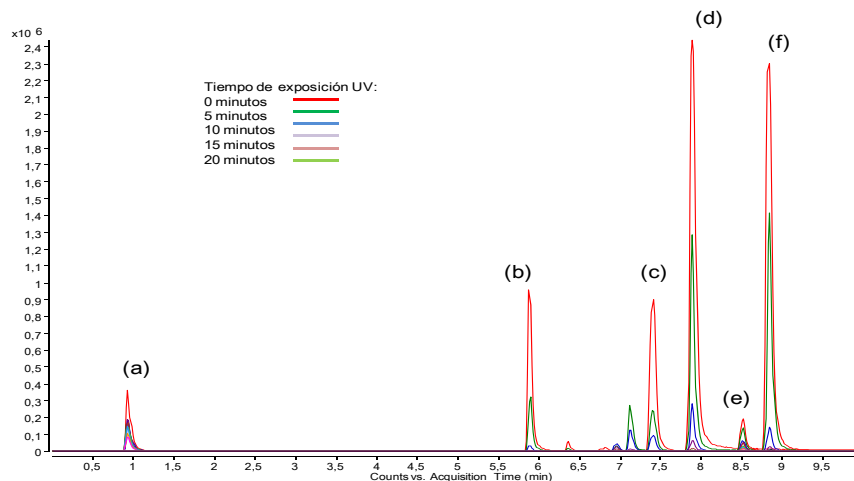


Figura 5.2.6. Ejemplo del seguimiento de la degradación de algunos de los plaguicidas mediante LC-TOFMS. Superposición de los EIC obtenidos para los algunos de los plaguicidas estudiados en los experimentos de exposición a la luz UV correspondientes a 0, 5, 10, 15 y 20 min de irradiación UV: (a) amitrole, (b) chlorotuloron, (c) diflufenican, (d) diazinon (e) oxyflourfen y (f) pyriproxifen.

5.2.3.3. Comportamiento cinético de los plaguicidas en disoluciones acuosas

El comportamiento cinético de la degradación de las plaguicidas ha sido monitorizado estudiando la influencia del tiempo de exposición ultravioleta sobre la concentración de los plaguicidas en la disolución acuosa, tal como se muestra en la Figura 5.2.7., en la que se muestran sólo los compuestos que exhibieron mayor resistencia a la luz ultravioleta. En general, la degradación de los plaguicidas fue mucho rápida en los experimentos con disoluciones acuosas, ya que en muchos casos sólo se requieren 5 a 10 minutos de exposición de la disolución para que la degradación sea prácticamente completa.

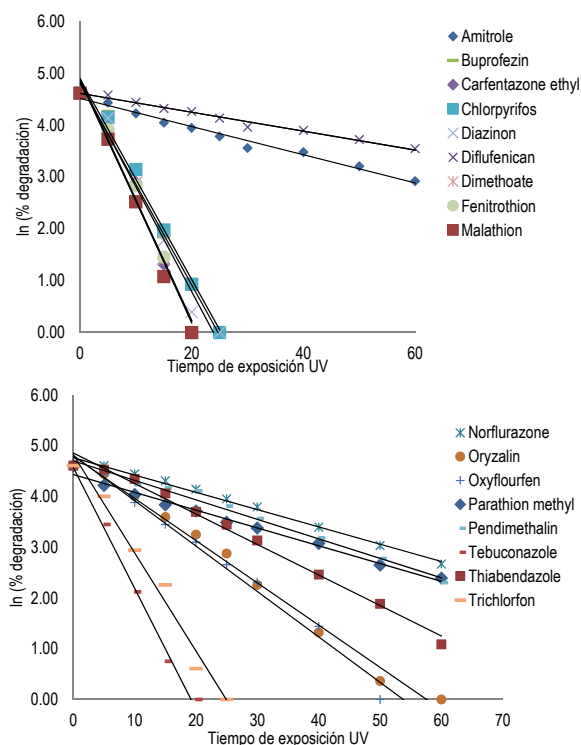


Figura 5.2.7. Demostración del comportamiento cinético de primer orden para la degradación de los plaguicidas que presentaron mayor resistencia a la luz ultravioleta.

En vista de los resultados, los plaguicidas han mostrado un comportamiento cinético de primer orden en las condiciones estudiadas. Esto quiere decir, que la velocidad de degradación es independiente de la concentración inicial del compuesto, en el agua, tal y como se dedujo de la correlación lineal observada entre el logaritmo neperiano del porcentaje de compuesto degradado y el tiempo de exposición a la luz ultravioleta (Figura 5.2.7). Esta figura, permite además determinar el tiempo de vida media (tiempo necesario de exposición UV, para que la concentración de plaguicidas se reduzca a la mitad de la inicial). Los valores de K y los $t_{1/2}$ estimados para cada plaguicida junto con los coeficientes de regresión se han incluido en la Tabla 5.2.7., de los que sólo 11 de los plaguicidas presentan $t_{1/2}$ mayores de 10 minutos.

Tabla 5.2.7. Parámetros cinéticos de los plaguicidas en estudio.

	<i>Plaguicida</i>	<i>Rango evaluado (min)</i>	<i>Coefficiente de regresión (R²)</i>	<i>K x 10³ (min⁻¹)</i>	<i>t_{1/2} (min)</i>
1	Amitrole	0-60	0.9822	2.71	25.57
2	Buprofezin	0-25	0.9800	19.38	3.58
3	Carbaryl	0-15	0.9900	31.42	2.21
4	Carfentrazone-ethyl	0-20	0.9817	23.49	2.95
5	Chlorpyrifos ethyl	0-25	0.9897	19.32	3.59
6	Chlorpyrifos methyl	0-60	0.9905	6.35	10.91
7	Chlorotoluron	0-15	0.9928	31.53	2.20
8	Diazinon	0-25	0.9805	20.19	3.43
9	Difeconazole	0-15	0.9968	31.04	2.23
10	Diflufenican	0-60	0.9854	1.82	38.08
11	Diuron	0-15	0.9867	30.75	2.25
12	Dimethoate	0-20	0.9831	23.08	3.00
13	Fenitrothion	0-20	0.9825	23.32	2.97
14	Fenoxycarb	0-10	0.9974	46.05	1.50
15	Fenthion	0-10	0.9989	46.05	1.50
16	Kresoxim methyl	0-10	0.9952	46.05	1.50
17	Malathion	0-20	0.9946	23.70	2.92
18	Methidathion	0-15	0.9950	30.40	2.28
19	Norflurazone	0-60	0.9903	3.40	20.38
20	Oryzalin	0-60	0.9910	8.34	8.31
21	Oxadiazon	0-15	0.9998	30.65	2.26
22	Oxyflourfen	0-50	0.9586	8.95	7.74
23	Parathion ethyl	0-15	0.9962	31.23	2.22
24	Parathion methyl	0-60	0.9882	3.51	19.74
25	Pendimethalin	0-60	0.9876	3.84	18.05
26	Phosalone	0-10	0.9991	46.05	1.50
27	Phosmet	0-10	0.9930	46.05	1.50
28	Pririmiphos methyl	0-10	0.9994	46.05	1.50
29	Procymidone	0-10	0.9905	46.05	1.50
30	Propiconazole	0-10	0.9789	46.05	1.50
31	Pyriproxifen	0-15	0.9930	31.19	2.22
32	Tebuconazole	0-20	0.9923	23.81	2.91
33	Thiabendazole	0-20	0.9900	6.02	11.51

	Plaguicida	Rango evaluado (min)	Coefficiente de regresión (R^2)	$K \times 10^3$ (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
34	Trichlorfon	0-25	0.9820	19.36	3.58
35	α -cypermethrin	0-60	0.9910	7.77	8.92
36	α -endosulfan	0-60	0.9904	6.47	10.71
37	β -endosulfan	0-60	0.9909	5.20	13.33
38	Deltamethrin	0-60	0.9904	6.47	10.71
39	Endosulfan sulfate	0-60	0.9900	5.45	12.72

K: Constante de velocidad

$t_{1/2}$: Tiempo de vida media

De acuerdo con estos resultados, el orden de degradación de los plaguicidas más resistentes en disoluciones acuosas bajo las condiciones experimentales de la luz ultravioleta utilizada es el siguiente: diflufenican < amitrole < norflurazone < parathion methyl < pendimethalin < β -endosulfan < endosulfan sulfate < thiabendazole < chlorpyrifos methyl. La mayor resistencia a la luz ultravioleta la presentó el diflufenican ($t_{1/2}$ 38 minutos), y la de mayor rapidez en degradarse el pirimiphos methyl ($t_{1/2}$ 1.5 minutos).

5.2.3.4. Identificación de productos de degradación en disoluciones acuosas

El análisis e identificación de los PDs mediante LC-TOFMS se llevó a cabo siguiendo las etapas descritas en la sección experimental. Se estudió individualmente la degradación de cada plaguicida para simplificar el estudio y poder así tener una visión de los PDs identificados.

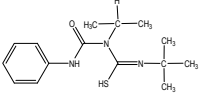
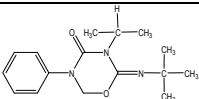
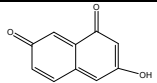
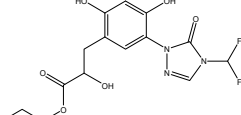
Se identificaron 74 PDs, mediante la examinación de los cromatogramas obtenidos a cada tiempo de exposición de la luz UV, se observó la aparición de picos cromatográficos y el aumento de su altura conforme aumentaba el tiempo de exposición. Estos picos cromatográficos corresponden a la formación de PDs, aunque

posteriormente, para algunos de ellos también se observó una disminución de la altura como consecuencia de la degradación de los mismos productos de degradación.

En este estudio se detectó la generación de un elevado número de PDs que no habían sido citados previamente en la bibliografía. Para la identificación tentativa de estos compuestos se recurrió al análisis de los espectros de masas experimentales para tratar así de esclarecer la identidad de los PDs. La determinación de la composición elemental más probable, según la masa/carga de los PDs, se ha realizado empleando la herramienta de cálculo de composiciones elementales del software.

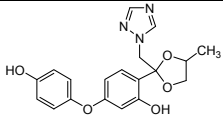
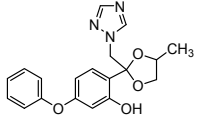
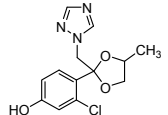
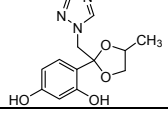
En la Tabla 5.2.8 se han incluidos los tiempos de retención, la composición elemental más probable de los PDs, las masa/carga teórica y experimental, el error en ppm, el valor de DBE, la estructura propuesta y las referencias bibliográficas en las que se encuentran descritos los compuestos en los casos en los que las especies están descritas previamente [110].

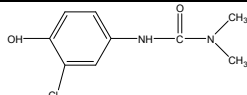
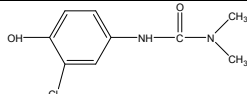
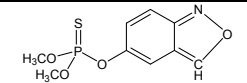
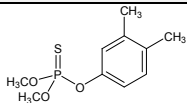
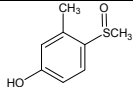
Tabla 5.2.8. Identificación de los PDs de los plaguicidas en los estudios en disolución acuosa: tiempos de retención (t_R), posible composición elemental de los PDs, las masa/carga teórica y experimental, el error en ppm, el número equivalente de dobles enlaces (DBE), referencias bibliográficas y estructura propuesta para los PDs.

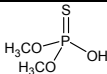
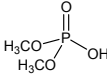
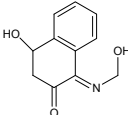
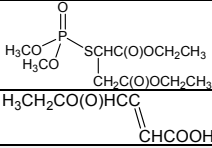
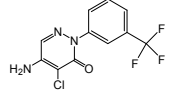
	Compuesto	t_R	Composición elemental	$[M+H]^+ m/z$ teórica	$[M+H]^+ m/z$ experimental	Error (ppm)	DBE	Referencia bibliográfica	Estructura propuesta
1	Amitrole	0.929	$C_2H_4N_4$	85.0509	85.0514	-	-		
2	Buprofezin	8.533	$C_{16}H_{23}N_3OS$	306.1659	306.1635	0.4	7		
2.1	Buprofezin PD1	7.458	$C_{15}H_{23}N_3OS$	294.1635	294.1637	0.96	6		
2.1.1	Frag. 1	7.458	$C_{11}H_{15}N_3OS$	238.1017	298.1015	1.71	6		
2.1.2	Frag. 2	7.458	$C_9H_{16}N_2OS$	201.1055	201.1056	0.60	3		
2.1.3	Frag. 3	7.458	$C_{10}H_{14}N_2O$	179.1176	179.1179	1.39	5		
2.1.4	Frag. 4	7.458	$C_5H_8N_2OS$	145.0430	145.0438	1.16	3		
2.2	Buprofezin PD2	5.002	$C_{16}H_{23}N_3O_2$	290.1863	290.1861	0.75	7		
2.2.1	Frag. 1	5.002	$C_{15}H_{23}N_3O$	262.1910	262.1914	1.30	6		
2.2.2	Frag. 2	5.002	$C_{12}H_{15}N_3O_2$	234.1235	234.1237	0.71	7		
3	Carbaryl	3.850	$C_{12}H_{11}NO_2$	202.0863	202.0858	1.8	8		
3.1.	Carbaryl PD1 (ESI(-))	7.410	$C_{10}H_6O_3$	173.0244	173.0236	4.52	8	[110]	
3.2.	Carbaryl PD2 (ESI(-))	6.149	C_7H_6O	105.0346	105.0348	1.73	5		
4	Carfentrazone-ethyl	7.280	$C_{15}H_{14}Cl_2F_3N_3O_3$	412.0437	412.0439	0.42	8		
4.1.	Carfentrazone-ethyl PD1	5.207	$C_{15}H_{17}F_2N_3O_6$	374.1154	374.1158	1.06	8		
4.1.2	Frag. 2	5.207	$C_{12}H_{11}F_2N_3O_4$	300.0783	300.08	1.62	8		
	Compuesto	t_R	Composición	$[M+H]^+ m/z$	$[M+H]^+ m/z$	Error	DBE	Referencia	Estructura

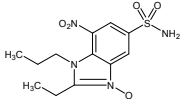
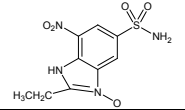
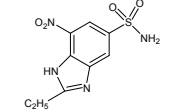
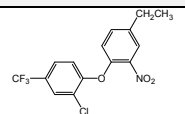
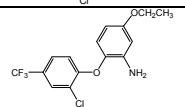
			<i>elemental</i>	<i>teórica</i>	<i>experimental</i>	<i>(ppm)</i>		<i>bibliográfica</i>	<i>propuesta</i>
4.2.1	Carfentrazone-ethyl PD2	6.134	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O ₂	320.0408	320.0397	0.26	8		
4.3	Carfentrazone-ethyl PD3	5.752	C ₁₅ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₅	356.1053	356.1055	0.57	9	[256]	
4.3.1	Frag. 1	5.752	C ₁₂ H ₁₀ ClF ₂ N ₃ O ₃	318.0443	318.0449	0.65	8		
4.4	Carfentrazone-ethyl PD4	5.138	C ₁₃ H ₁₁ F ₂ N ₃ O ₅	328.0742	328.074	0.76	9		
5	Chlorpyrifos ethyl	9.120	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	349.9336	349.9336	0.5	4		
5.1	Chlorpyrifos PD1	6.904	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₄ P	333.9564	333.9562	0.09	4	[110]	
5.1.1	Frag. 1	6.904	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₄ P	305.9254	305.9251	0.80	4		
5.1.2	Frag. 2	6.904	C ₅ H ₃ Cl ₃ NO ₄ P	277.8933	276.8865	0.94	4		
5.2	Chlorpyrifos PD2	6.360	C ₅ H ₉ Cl ₂ N ₅ O ₅ S	321.9773	321.9774	0.42	3		
5.2.1	Frag. 1	6.360	C ₆ H ₄ Cl ₃ NO ₃	243.9332	243.9323	0.81	4		
6	Chlorpyrifos methyl	6.210	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	321.9023	321.9014	0.65	4		
7	Chlorotoluron	5.807	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	213.0789	213.0789	0.43	5		
7.1	Chlorotoluron PD1	5.600	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	177.1016	177.1019	1.92	6		
	<i>Compuesto</i>	<i>t.R.</i>	<i>Composición</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>Error</i>	<i>DBE</i>	<i>Referencia</i>	<i>Estructura</i>

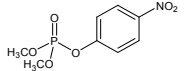
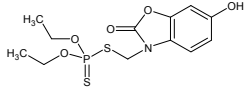
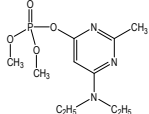
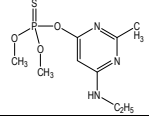
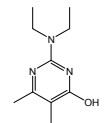
			<i>elemental</i>	<i>teórica</i>	<i>experimental</i>	<i>(ppm)</i>		<i>bibliográfica</i>	<i>propuesta</i>
7.2	Chlorotoluron PD2	5.043	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂	195.1128	195.1128	0.26	5		
7.3	Chlorotoluron PD3	5.509	C ₇ H ₈ ClN	142.0418	142.0418	0.50	3	[263]	
8	Diazinon	8.001	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	305.1083	305.1083	0.5	5		
8.1	Diazinon PD1	2.799	C ₈ H ₁₂ N ₂ O	153.1022	153.102	2.01	4	[264]	
9	Difeconazole	7.568	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406.072	406.072	0.56	12		
9.1	Difeconazole PD1	5.301	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	388.1062	388.1059	0.88	12		
9.1.1	Frag. 1	5.301	C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₃	370.0958	370.0953	1.47	13		
9.1.2	Frag. 2	5.301	C ₁₈ H ₁₈ ClN ₃ O ₃	360.1107	360.1109	0.44	11		
9.2	Difeconazole PD2	5.510	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	388.1060	388.1059	0.28	12		
9.2.1	Frag. 1	5.510	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₄	350.1136	350.1135	0.31	14		
9.3.	Difeconazole PD3	4.900	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃	260.1028	260.103	0.52	9		
	<i>Compuesto</i>	<i>t.R.</i>	<i>Composición</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>Error</i>	<i>DBE</i>	<i>Referencia</i>	<i>Estructura</i>

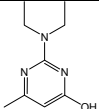
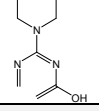
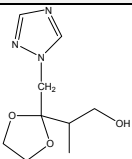
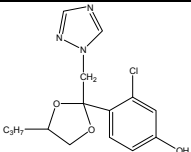
			<i>elemental</i>	<i>teórica</i>	<i>experimental</i>	<i>(ppm)</i>		<i>bibliográfica</i>	<i>propuesta</i>
9.4	Difeconazole PD4	5.124	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅	370.1383	370.1387	1.97	13		
9.4.1	Frag. 1	5.124	C ₈ H ₁₄ ClN ₇ O	260.1029	260.1028	1.89	5		
9.4.2	Frag. 2	5.124	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₅	326.0786	326.0771	0.74	18		
9.4.3	Frag. 3	5.124	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄	288.0972	288.0974	1.40	10		
9.5	Difeconazole PD5	5.365	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₆	384.1187	384.119	0.69	13		
9.5.1	Frag. 1	5.365	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	352.1292	352.1292	0.02	13		
9.5.2	Frag. 2	5.365	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.1228	166.1226	0.90	4		
9.6	Difeconazole PD6	5.189	C ₁₅ H ₁₅ N ₉ O ₃	370.1384	370.1377	1.67	13		
9.6.1	Frag. 1	5.189	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₃	294.0874	294.0873	0.83	13		
9.6.2	Frag. 2	5.189	C ₈ H ₁₄ ClN ₇ O	260.1029	260.1027	1.89	5		
9.7	Difeconazole PD7	6.244	C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₃	370.0954	370.0953	0.38	13		
9.8	Difeconazole PD8	6.003	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₄	354.1427	354.1448	0.52	12		
9.9	Difeconazole PD9	5.762	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	352.1292	352.1292	0.62	13		
9.10	Difeconazole PD10	5.249	C ₁₃ H ₁₄ ClN ₃ O ₃	296.0796	296.0796	1.98	8		
9.11	Difeconazole PD11	4.800	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₄	278.1138	278.1135	1.05	8		
9.11.1	Frag. 1	4.800	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	209.0808	209.0808	0.20	6		
9.12	Difeconazole PD12	2.909	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃	260.1029	260.103	0.15	9		
9.12.1	Frag. 1	5.249	C ₅ H ₁₄ N ₃ O ₄	179.1143	179.1139	1.64	1		
	<i>Compuesto</i>	<i>t_R</i>	<i>Composición</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>Error</i>	<i>DBE</i>	<i>Referencia</i>	<i>Estructura</i>

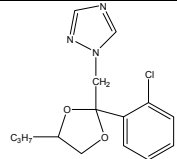
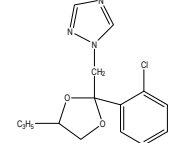
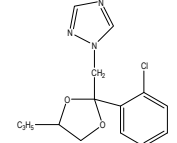
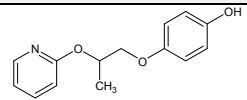
			<i>elemental</i>	<i>teórica</i>	<i>experimental</i>	<i>(ppm)</i>		<i>bibliográfica</i>	<i>propuesta</i>
10	Diiflufenican	8.163	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	395.0813	395.0813	0.21	13		
11	Dimethoate	5.208	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	230.0069	230.0066	0.08	1		
12	Diuron	6.040	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233.0249	233.0244	0.37	5		
12.1	Diuron PD1	4.960	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	215.0584	215.0586	1.02	5	[255]	
12.2	Diuron PD2	5.170	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	215.0582	215.0581	0.48	5	[255]	
12.2.1	Frag. 1	5.170	C ₇ H ₁₀ N ₆ O	195.0995	195.0991	1.97	6		
13	Fenitrothion	7.015	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	278.0247	278.0247	1.19	5		
13.1	Fenitrothion PD1	5.660	C ₉ H ₁₀ NO ₄ PS	260.0141	260.0140	0.48	6	[110]	
13.2	Fenitrothion PD2	6.030	C ₉ H ₁₀ N ₄ OS	233.1156	233.1099	1.37	7		
13.3	Fenitrothion PD3	5.500	C ₆ H ₅ N ₃ O ₇	232.0207	232.0209	1.90	6		
14	Fenoxycarb	5.089	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	302.1387	302.1387	0.73	9		
14.1	Fenoxycarb PD1	1.051	C ₉ H ₂₁ NO ₂	176.1637	176.164	1.46	0		
15	Fenthion	7.625	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	279.0273	279.0273	1.02	4		
15.1	Fenthion PD1	5.755	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS	247.0552	247.0550	0.85	4		
15.2	Fenthion PD2	4.551	C ₈ H ₁₀ O ₂ S	171.0474	171.0476	0.77	4	[110]	
15.2.1	Frag. 1	4.551	C ₃ H ₁₀ NO ₂ PS	156.0244	156.0543	0.83	0		
	<i>Compuesto</i>	<i>t.R.</i>	<i>Composición</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>[M+H]⁺ m/z</i>	<i>Error</i>	<i>DBE</i>	<i>Referencia</i>	<i>Estructura</i>

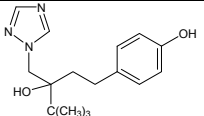
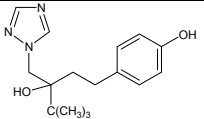
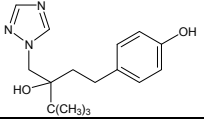
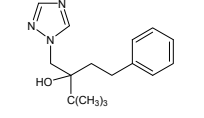
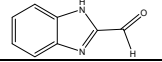
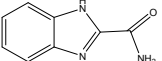
			<i>elemental</i>	<i>teórica</i>	<i>experimental</i>	<i>(ppm)</i>		<i>bibliográfica</i>	<i>propuesta</i>
15.3	Fenthion PD3	1.124	C ₂ H ₇ O ₃ PS	142.9926	142.9926	1.44	0	[110]	
15.4	Fenthion PD4	0.970	C ₂ H ₇ O ₄ P	127.0156	127.0155	1.50	0	[110]	
16	Kresoxin methyl	7.784	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.1387	314.1387	0.81	10		
16.1	Kresoxin methyl PD1	5.469	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	282.1127	282.1125	0.87	11		
16.1.1	Frag. 1	5.469	C ₁₆ H ₁₅ NO	238.1226	238.1226	0.02	10		
16.1.2	Frag. 2	5.469	C ₈ H ₅ N	116.0499	116.0498	1.37	7		
16.2	Kresoxin methyl PD2	8.421	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	206.0817	206.0812	0.86			
17	Malathion	7.106	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	331.0433	331.0431	0.66	2		
17.1	Malathion PD1	6.575	C ₁₀ H ₁₉ O ₇ PS	315.0662	315.0657	1.57	2	[265]	
17.1.1	Frag. 1	6.575	C ₈ H ₁₃ O ₆ PS	269.0243	269.0246	1.19	3		
17.1.2	Frag. 2	6.575	C ₄ H ₂ O ₃	99.0077	99.0077	0.01	4		
17.2.	Malathion PD2	0.942	C ₆ H ₈ O ₄	145.0495	145.0494	0.58	3	[110]	
17.2.1	Frag. 1	0.942	C ₆ H ₆ O ₃	127.0388	127.039	1.36	4		
18	Methidathion	5.541	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	302.9691	302.9691	0.19			
19	Norflurazone	6.028	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O	304.0459	304.0459	0.5	8		
19.1	Norflurazone PD1	5.773	C ₁₁ H ₇ ClF ₃ N ₃ O	290.0303	290.03	1.03	8	[255]	
20	Oryzalin	6.957	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₆ S	347.102	347.102	0.35	6		
	<i>Compuesto</i>	<i>t.R.</i>	<i>Composición elemental</i>	<i>[M+H]⁺ m/z teórica</i>	<i>[M+H]⁺ m/z experimental</i>	<i>Error (ppm)</i>	<i>DBE</i>	<i>Referencia bibliográfica</i>	<i>Estructura propuesta</i>

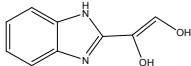
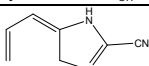
20.1	Oryzalin PD1	5.034	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ O ₅ S	329.0913	329.0914	1.11	7	[110]	
20.2	Oryzalin PD2	4.740	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₅ S	287.0446	287.0445	0.36	7	[110]	
20.3	Oryzalin PD3	4.922	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₄ S	271.0497	271.0496	0.48	7	[110, 266]	
21	Oxadiazon	9.055	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	345.0767	345.0764	0.88	7		
22	Oxyflourfen	8.501	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	362.0401	362.0401	0.03	9		
22.1	Oxyflourfen PD1	6.340	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₃	346.0452	346.0452	0.93	9	[255]	
22.1.1	Frag. 1	6.340	C ₁₀ H ₁₁ ClF ₃ N ₅ O	310.0678	310.0677	0.21	6		
22.2	Oxyflourfen PD2	6.700	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₃	346.0452	346.0452	0.18	9	[255]	
22.3	Oxyflourfen PD3	7.780	C ₁₅ H ₁₃ ClF ₃ NO ₂	332.066	332.066	1.37	8	[267]	
23	Parathion ethyl	7.463	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	362.0401	362.0401	0.03	9		
24	Parathion methyl	4.876	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	292.0403	292.0396	2.28	5		
	Compuesto	t.R.	Composición elemental	[M+H] ⁺ m/z teórica	[M+H] ⁺ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencia bibliográfica	Estructura propuesta

24.1	Parathion methyl PD1	3.858	C ₈ H ₁₀ NO ₆ P	248.0319	248.0320	1.29	5		
25	Pendimethalin	9.097	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₄	281.3100	292.0405	0.64	5		
26	Phosalone	8.014	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	367.9941	367.9936	1.39	6		
26.1	Phosalone PD1	6.27	C ₁₂ H ₁₆ NO ₅ PS ₂	350.0280	350.0280	0.00	6		
26.1.1	Frag. 1	6.27	C ₈ H ₈ NO ₃	164.0342	164.0344	1.11	7		
26.2	Phosalone PD2	0.91	C ₇ H ₁₇ NO ₃	164.1281	164.1279	1.24	0		
27	Phosmet	6.572	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	318.0018	318.0010	1.60	7		
27.1.1	Frag. 1	5.058	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	260.1645	260.1647	0.61	7		
27.1.2	Frag. 2	5.058	C ₁₄ H ₂₅ NO	224.2009	224.2007	0.66	3		
28	Pirimyphos methyl	8.046	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	306.1036	306.1035	0.13	4		
28.1	Pirimyphos methyl PD1	4.988	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₄ P	290.1263	290.1264	0.34	4	[110]	
28.2	Pirimyphos methyl PD2	5.157	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	278.0723	278.0728	1.54	4	[110]	
28.3	Pirimyphos methyl PD3	4.852	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O	196.1444	196.1445	0.02	4		
	Compuesto	t.r.	Composición elemental	[M+H] ⁺ m/z teórica	[M+H] ⁺ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencia bibliográfica	Estructura propuesta

28.4	Pirimyphos methyl PD4	2.147	C ₉ H ₁₅ N ₃ O	182.1288	182.1288	0.03	4	[110]	
28.4.1	Frag. 1	2.147	C ₇ H ₁₁ N ₃ O	154.0975	154.0975	0.23	4	[110]	
28.5	Pirimyphos methyl PD5	1.294	C ₈ H ₁₅ N ₃ O	170.1288	170.1286	1.20	3		
28.5.1.	Frag. 1	1.294	C ₇ H ₁₅ N ₃ O	158.1287	158.1288	0.43	2		
28.5.2	Frag. 2	1.294	C ₅ H ₁₃ N ₃	116.1181	116.1182	0.88	1		
29	Procymidone	7.219	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	284.024	284.024	0.43	8		
29.1	Procymidone PD1	6.520	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	161.9872	161.9873	1.23	4	[268]	
30	Propiconazole	9.875	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	342.0771	342.0773	0.69	8		
30.1	Propiconazole PD1	6.326	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₃	214.1186	214.1183	1.31	4		
30.1.1	Frag. 1	6.326	C ₄ H ₅ N ₃ O ₂	128.0455	128.0452	2.13	4		
30.2.	Propiconazole PD2	6.965	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O ₂	238.0378	238.0376	0.71	8		
30.2.1	Frag. 1	6.965	C ₁₀ H ₆ ClN ₃ O	220.0272	220.027	0.9	9		
30.3.	Propiconazole PD3	8.033	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O ₃	324.1109	324.1105	1.52	8		
30.3.1	Frag. 1	8.033	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O ₂	238.0378	238.0381	1.19	8		
30.3.2	Frag. 2	8.033	C ₁₀ H ₆ ClN ₃ O	220.0272	220.0271	0.27	9		
30.3.3	Frag. 3	8.033	C ₁₁ H ₁₇ NO	180.1383	180.1386	1.59	4		
30.3.4	Frag. 4	8.033	C ₈ H ₁₇ NO	144.1383	144.1382	0.59	1		
	Compuesto	<i>t.R.</i>	Composición elemental	[M+H] ⁺ m/z teórica	[M+H] ⁺ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencia bibliográfica	Estructura propuesta

30.4	Propiconazole PD4	9.188	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	308.1160	308.1153	2.26	8	[110]	
30.4.1	Frag. 1	9.188	C ₁₆ H ₈ N ₆ O ₂	245.0781	245.0787	2.35	10		
30.4.2	Frag. 2	9.188	C ₁₀ H ₈ O ₃	177.0546	177.0547	0.57	7		
30.5.	Propiconazole PD5	9.248	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	306.1004	306.1002	0.65	9		
30.5.1	Frag. 1	9.248	C ₁₀ H ₆ ClN ₃ O	220.0272	220.0273	0.45	9		
30.6	Propiconazole PD6	9.647	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	306.1004	306.1009	1.98	9		
30.6.1.	Frag. 1	9.647	C ₁₂ H ₁₂ N ₆ O ₂	273.1095	273.1100	1.83	10		
31	Pyriproxifen	9.009	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	322.1438	322.1438	0.97	20		
31.1	Pyriproxifen PD1	5.998	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃	246.1125	246.1125	0.01	8		
31.1.1	Frag. 1	5.998	C ₈ H ₅ NO	96.0448	96.0447	1.89	4		
31.2	Pyriproxifen PD2	7.121	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	227.1069	227.1067	0.89	9		
31.2.1	Frag. 1	7.121	C ₈ H ₅ NO	96.0446	96.0445	1.88	4		
31.3	Pyriproxifen PD3	3.539	C ₈ H ₅ NO	96.0446	96.0445	1.83	4		
32	Tebuconazole	6.939	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	308.1524	308.1527	0.82	7		
	Compuesto	<i>t.R.</i>	Composición elemental	[M+H] ⁺ m/z teórica	[M+H] ⁺ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencia bibliográfica	Estructura propuesta

32.1	Tebuconazole PD1	5.264	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₂	290.1862	290.1863	0.36	7		
32.2	Tebuconazole PD2	5.400	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₂	290.1863	290.1863	0.01	7		
32.2.1	Frag. 1	5.400	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O	272.1754	272.1757	1.16	8		
32.2.2	Frag. 2	5.400	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.1228	166.1226	0.76	4		
32.3	Tebuconazole PD3	5.480	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₂	290.1863	290.1863	0.15	7		
32.3.1	Frag. 1	5.480	C ₁₃ H ₂₃ NO ₂	226.1797	226.1802	2.03	3		
32.4	Tebuconazole PD4	6.332	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O	274.1914	274.1915	0.54	7		
32.4.1	Frag. 1	6.332	C ₁₀ H ₁₂ N ₆ O ₃	265.1048	265.1044	1.64	8		
32.4.2	Frag. 2	6.332	C ₁₂ H ₁₈ N ₂	191.1542	191.1543	0.27	5		
32.4.3	Frag. 3	6.332	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	175.1229	175.123	0.20	6		
32.4.4	Frag. 4	6.332	C ₆ H ₈ O ₂	113.0601	113.0599	1.93	3		
32.5	Tebuconazole PD5	6.869	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O	272.1757	272.1758	0.29	8		
33	Thiabendazole	4.377	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	202.0433	202.0438	2.09	9		
33.1.	Thiabendazole PD1	1.319	C ₈ H ₆ N ₂ O	147.0553	147.0553	0.12	6		
33.1.1.	Frag.1	1.319	C ₇ H ₆ N ₂	119.0604	119.0596	6.47	7		
33.2	Thiabendazole PD2	6.270	C ₈ H ₇ N ₃ O	162.0662	162.0664	1.54	6		
	Compuesto	t. _R .	Composición elemental	[M+H] ⁺ m/z teórica	[M+H] ⁺ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencia bibliográfica	Estructura Propuesta

33.3.	Thiabendazole PD3	6.470	$C_9H_8N_2O_2$	177.0659	177.0656	1.49	8		
33.4.	Thiabendazole PD4	7.330	$C_8H_5N_3$	144.0556	144.0558	1.04	7	[110, 255]	
34	Trichlorfon	3.241	$C_4H_8Cl_3O_4P$	256.9299	256.9303	1.86	0		

En la Tabla 5.2.9., se incluye el estudio de la evolución de los PDs generados durante el tiempo de exposición a la luz UV. Como se puede apreciar, algunos PDs presentaron una permanencia mayor que los compuestos originarios y se necesitaría un tratamiento más agresivo para su degradación.

Tabla 5.2.9. Persistencia de los PDs generados (expresados en porcentaje) durante el experimento en disolución acuosa durante el tiempo de exposición UV.

Compuesto	Tiempo de exposición UV (minutos)									
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60
Amitrole										
Buprofezin										
Buprofezin PD1	0.00	100.00	51.38	33.14	20.66	19.19	2.03	0.65	0.00	0.00
Buprofezin PD2	0.00	100.00	78.48	24.17	20.95	4.97	0.00	0.00	0.00	0.00
Carbaryl										
Carbaryl PD1	0.00	0.00	28.45	46.86	53.36	72.20	78.81	79.00	78.89	100.00
Carbaryl PD2	0.00	63.60	87.58	98.14	100.00	95.39	85.00	56.63	33.90	0.00
Carfentrazone-ethyl										
Carfentrazone-ethyl PD1	0.00	14.07	33.16	47.00	62.98	90.51	100.00	78.90	67.93	45.56
Carfentrazone-ethyl PD2	0.00	64.58	99.37	100.00	63.75	14.69	3.78	0.00	0.00	0.00
Carfentrazone-ethyl PD3	0.00	25.47	55.88	77.50	92.97	98.58	100.00	81.97	60.89	34.15
Carfentrazone-ethyl PD4	0.00	13.59	28.23	42.23	58.84	90.03	100.00	74.62	58.07	43.27
Chlorpyrifos ethyl										
Chlorpyrifos PD1	0.00	100.00	96.14	46.89	17.41	8.48	5.19	0.00	0.00	0.00
Chlorpyrifos PD2	0.00	37.85	93.15	100.00	79.90	56.90	32.33	13.12	0.00	0.00
Chlorotoluron										
Chlorotoluron PD1	0.00	100.00	94.34	62.78	30.23	11.07	0.00	0.00	0.00	0.00
Chlorotoluron PD2	0.00	100.00	81.83	36.20	13.29	5.13	1.61	0.00	0.00	0.00
Chlorotoluron PD3	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Diazinon										
Diazinon PD1	0.00	100.00	74.37	23.99	7.73	3.15	0.83	0.24	0.00	0.00
Difeconazole										
Difeconazole PD1	0.00	19.49	100.00	39.05	31.22	25.53	26.54	18.01	8.81	6.49
Difeconazole PD2	0.00	5.43	100.00	31.95	31.31	31.44	27.54	17.02	7.38	3.54
Difeconazole PD3	0.00	0.00	100.00	89.50	72.57	58.94	58.52	53.17	39.36	21.58
Difeconazole PD4	0.00	12.54	100.00	14.59	8.16	3.63	1.71	0.64	0.00	0.00
Difeconazole PD5	0.00	36.83	100.00	41.14	13.27	9.56	0.00	0.00	0.00	0.00
Difeconazole PD6	0.00	0.00	100.00	33.92	31.33	37.30	28.18	11.38	5.73	0.00
Difeconazole PD7	0.00	20.02	100.00	15.63	11.13	7.11	4.15	1.58	0.79	0.00
Difeconazole PD8	0.00	100.00	59.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Difeconazole PD9	0.00	19.04	100.00	19.23	14.23	8.96	5.36	1.44	0.43	0.00
Difeconazole PD10	0.00	55.90	100.00	8.61	1.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Difeconazole PD11	0.00	12.36	100.00	16.67	9.63	5.50	3.14	0.60	0.27	0.00
Difeconazole PD12	0.00	6.86	100.00	23.70	17.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Diflufenican										
Compuesto	Tiempo de exposición UV (minutos)									

	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60
Dimethoate										
Diuron										
Diuron PD1	0.00	100.00	73.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Diuron PD2	0.00	100.00	55.54	34.64	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fenitrothion										
Fenitrothion PD1	0.00	56.14	98.82	100.00	87.96	73.46	54.59	34.97	24.17	17.13
Fenitrothion PD2	0.00	54.28	92.71	97.83	100.00	91.82	91.15	91.32	87.15	83.10
Fenitrothion PD3	0.00	27.14	86.38	100.00	70.19	56.02	30.70	9.51	5.87	0.00
Fenoxycarb										
Fenoxycarb PD1	0.00	100.00	5.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fenthion										
Fenthion PD1	0.00	100.00	38.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fenthion PD2	0.00	100.00	6.35	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fenthion PD3	0.00	62.62	100.00	95.86	32.03	32.90	32.10	27.73	0.00	0.00
Fenthion PD4	0.00	32.21	37.26	38.70	50.78	54.47	72.55	78.69	91.20	100.00
Kresoxin methyl										
Kresoxin methyl PD1	0.00	100.00	51.75	12.94	1.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Kresoxin methyl PD2	0.00	100.00	7.93	6.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Malathion										
Malathion PD1	0.00	30.18	86.50	100.00	67.52	37.25	22.64	0.00	0.00	0.00
Malathion PD2	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methidathion										
Norflurazone										
Norflurazone PD1	0.00	0.00	12.74	27.11	48.99	66.14	79.57	100.00	98.25	88.62
Oryzalin										
Oryzalin PD1	0.00	44.03	80.03	95.11	100.00	83.25	72.29	43.68	22.53	15.60
Oryzalin PD2	0.00	31.74	53.42	75.57	92.18	92.30	100.00	90.47	76.16	70.55
Oryzalin PD3	0.00	27.44	61.37	70.90	80.62	86.89	90.37	100.00	94.40	89.74
Oxadiazon										
Oxyflourfen										
Oxyflourfen PD1	0.00	0.00	0.00	44.34	49.07	100.00	84.42	82.15	60.02	35.61
Oxyflourfen PD2	0.00	91.35	100.00	66.22	38.66	25.38	15.45	0.00	0.00	0.00
Oxyflourfen PD3	0.00	82.72	100.00	93.84	92.73	85.19	80.10	58.22	41.03	19.66
Parathion ethyl										
Parathion methyl										
Parathion methyl PD1	0.00	0.00	24.44	26.77	31.45	32.92	56.15	62.10	76.57	100.00
Pendimethalin										
Phosalone										
Phosalone PD1	0.00	100.00	10.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phosalone PD2	0.00	100.00	11.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phosmet										
Pirimyphos methyl										
Pirimyphos methyl PD1	0.00	5.54	65.58	90.00	93.26	100.00	85.01	77.11	68.17	58.06
Pirimyphos methyl PD2	0.00	100.00	18.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pirimyphos methyl PD3	0.00	100.00	88.74	88.61	73.81	73.44	71.04	68.74	67.95	53.58
Pirimyphos methyl PD4	0.00	100.00	76.87	63.64	46.69	33.48	23.84	13.73	7.86	4.61
Pirimyphos methyl PD5	0.00	10.26	38.65	64.04	90.31	98.01	100.00	86.91	83.42	60.96
Compuesto	Tiempo de exposición UV (minutos)									
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60

Procymidone										
Procymidone PD1	0.00	100.00	42.06	20.35	15.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Propiconazole										
Propiconazole PD1	0.00	0.00	28.26	57.59	54.22	59.98	91.23	100	98.6	88.77
Propiconazole PD2	0.00	0.00	23.56	46.51	69.23	78.16	91.56	100.00	98.21	93.03
Propiconazole PD3	0.00	68.72	100.00	83.44	63.67	54.37	41.75	25.00	14.44	9.21
Propiconazole PD4	0.00	100.00	63.81	18.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Propiconazole PD5	0.00	0.00	23.85	42.92	71.74	81.68	88.12	100.00	83.06	83.62
Propiconazole PD6	0.00	100.00	21.38	2.86	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pyriproxifen										
Pyriproxifen PD1	0.00	93.96	100.00	48.28	13.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pyriproxifen PD2	0.00	100.00	49.87	5.25	0.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pyriproxifen PD3	0.00	42.01	100.00	68.68	42.38	26.28	13.55	1.83	0.83	0.00
Tebuconazole										
Tebuconazole PD1	0.00	0.00	100.00	69.17	38.30	20.29	10.84	6.19	3.50	0.00
Tebuconazole PD2	0.00	0.00	100.00	56.67	26.06	9.32	4.69	1.40	0.28	0.00
Tebuconazole PD3	0.00	80.03	100.00	12.26	11.72	8.42	6.34	5.75	1.37	0.00
Tebuconazole PD4	0.00	77.40	100.00	70.88	55.95	38.83	26.04	17.24	7.64	0.00
Tebuconazole PD5	0.00	66.79	100.00	79.79	67.56	53.72	43.89	36.45	23.00	14.87
Thiabendazole										
Thiabendazole PD1	0.00	4.62	15.36	40.99	60.43	91.1	91.29	100	98	59.08
Thiabendazole PD2	0.00	9.72	24.64	40.77	51.71	67.73	77.96	93.42	100	93.11
Thiabendazole PD3	0.00	0.00	30.31	45.46	54.88	65.2	93.61	100.00	93.6	91.18
Thiabendazole PD4	0.00	5.37	17.71	32.1	42.67	59.4	62.33	78.9	97.8	100.00
Trichlorfon										

A modo de ejemplo, en las Figuras 5.2.8., 5.2.9 y 5.2.10., se recogen los EICs de los compuestos degradados por UV en disoluciones acuosas y sus PDs, para buprofezin, diuron y fenthion.

a)

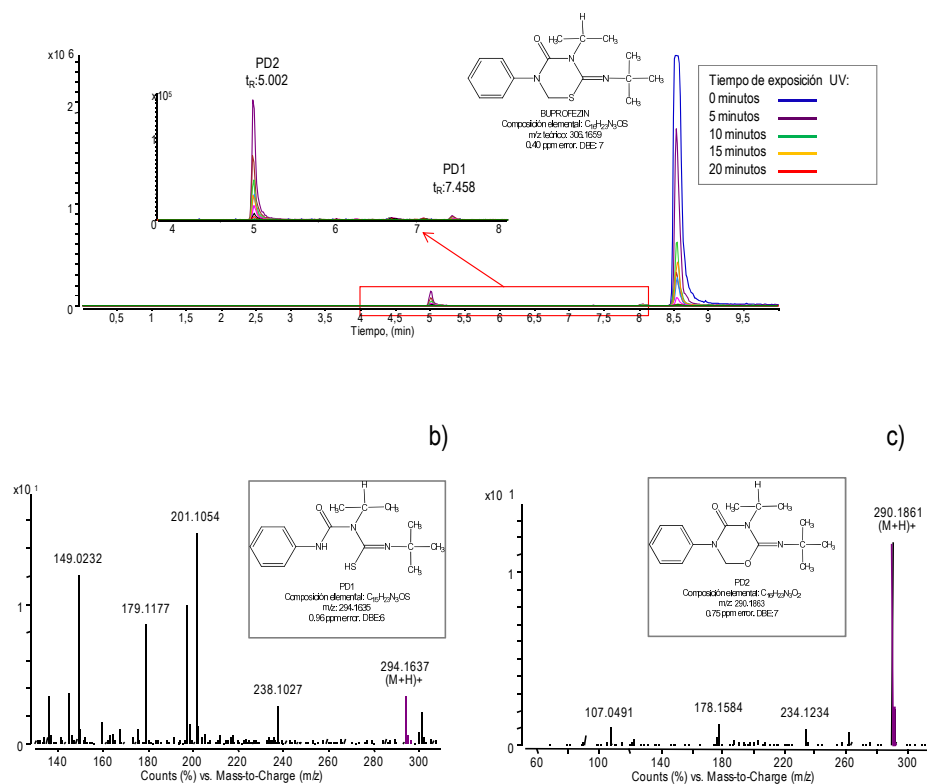
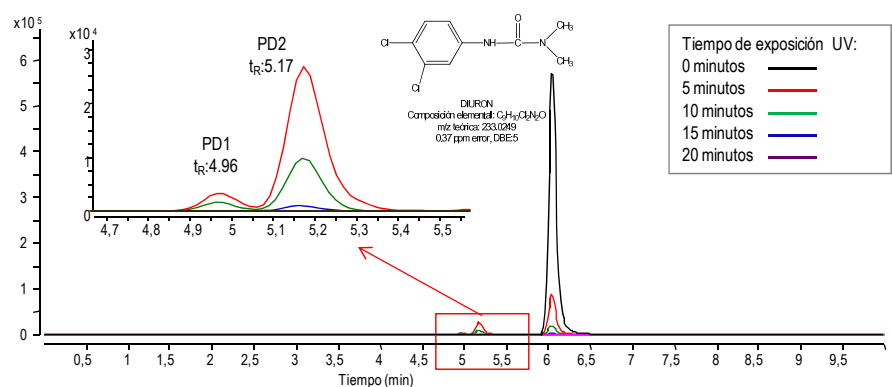


Figura 5.2.8. a) Superposición de los EICs obtenidos para bupropion y sus PDs en los experimentos de exposición a la luz UV correspondientes a 0, 5, 10, 15 y 20 min de irradiación UV; b) y c). EICs de los PD1 y PD2 con la estructura propuesta.

(a)



(b)

(c)

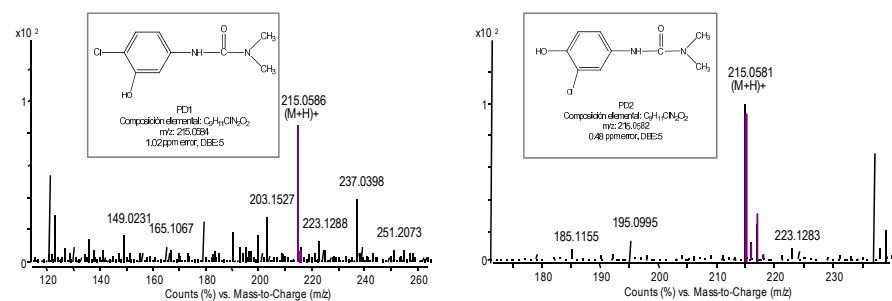


Figura 5.2.9. (a) Superposición de los EICs obtenidos para diuron y sus PDs en los experimentos de exposición a la luz UV correspondientes a 0, 5, 10, 15 y 20 min de irradiación UV; (b) y (c). EICs de los PD1 y PD2 con la estructura propuesta.

(a)

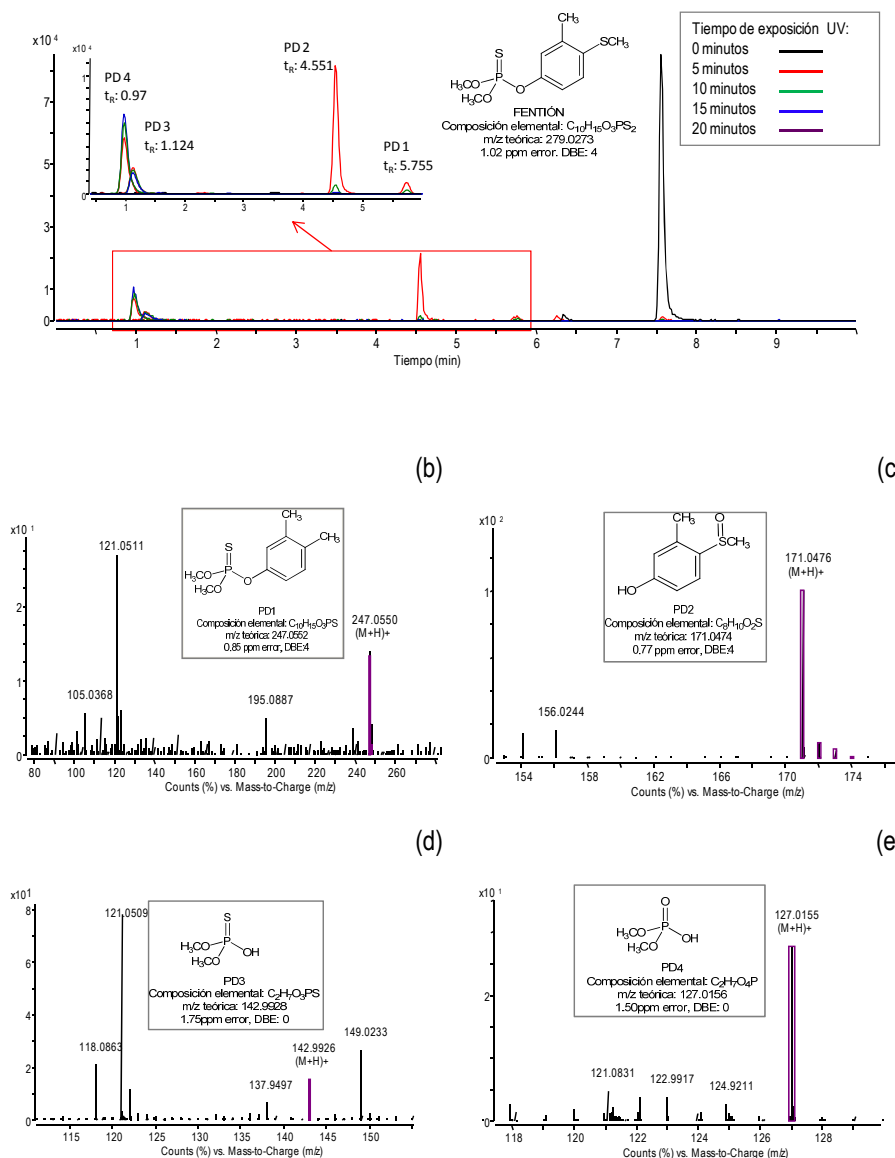


Figura 5.2.10. (a) Superposición de los EICs obtenidos para fenthion y sus PDs en los experimentos de exposición a la luz UV correspondientes a 0, 5, 10, 15 y 20 min de irradiación UV; (b),(c),(d) y (e). EICs de los PD1, PD2, PD3 y PD4 con la estructura propuesta.

5.2.3.5. Predicción de la toxicidad de los plaguicidas y sus productos de degradación

Con el fin de evaluar la toxicidad de los plaguicidas y sus PDS, a través del programa informático T.E.S.T. [259], se llevó a cabo la estimación de toxicidad, empleando como parámetro la tasa de toxicidad oral en ratas LD_{50} . Los resultados se muestran en la Tabla 5.2.10 y la Figura 5.2.11. La principal limitación del método de predicción empleado es la necesidad de proporcionar la estructura molecular de la especie, que no estaba disponible en todos los PDs detectados.

Tabla 5.2.10. Predicción de la toxicidad de los PDs mediante T.E.S.T.[259].

Compuesto	Oral en ratas LD_{50} (mg/L)	Compuesto	Oral en ratas LD_{50} (mg/L)
Amitrole	1092.52	Diazinon PD1	352.59
Buprofezin	1241.88	Difeconazole	763.62
Buprofezin PD1	999.94	Difeconazole PD1	1413.65
Buprofezin PD2	1171.99	Difeconazole PD2	1413.65
Carbaryl	1109.67	Difeconazole PD3	1658.22
Carbaryl PD1	239.31	Difeconazole PD4	1744.73
Carbaryl PD2	N.D.	Difeconazole PD5	N.D.
Carfentrazone-ethyl	1205.40	Difeconazole PD6	N.D.
Carfentrazone-ethyl PD1	1832.72	Difeconazole PD7	N.D.
Carfentrazone-ethyl PD2	319.54	Difeconazole PD8	1461.73
Carfentrazone-ethyl PD3	3065.12	Difeconazole PD9	N.D.
Carfentrazone-ethyl PD4	1760.52	Difeconazole PD10	1050.69
Chlorpyrifos ethyl	107.95	Difeconazole PD11	1749.42
Chlorpirifos PD1	282.48	Difeconazole PD12	N.D.
Chlorpirifos PD2	323.61	Diflufenican	1197.13
Chlorpyrifos methyl	602.78	Dimethoate	104.69
Chlorotoluron	2373.79	Diurón	763.84
Chlorotoluron PD1	N.D.	Diurón PD1	1228.13
Chlorotoluron PD2	1649.89	Diurón PD2	1228.13
Chlorotoluron PD3	371.13	Fenitrothion	43.33
Diazinon	130.65	Fenitrothion PD1	30.66
Compuesto	Oral en ratas LD_{50} (mg/L)	Compuesto	Oral en ratas LD_{50} (mg/L)
Fenitrothion PD2	132.53	Phosalone PD2	N.D.

Fenitrothion PD3	N.D.	Phosmet	38.90
Fenoxycarb	1296.76	Pirimyphos methyl	151.57
Fenoxycarb PD1	N.D.	Pirimyphos methyl PD1	249.83
Fenthion	50.71	Pirimyphos methyl PD2	295.74
Fenthion PD1	855.06	Pirimyphos methyl PD3	1811.19
Fenthion PD2	1684.56	Pirimyphos methyl PD4	682.23
Fenthion PD3	1257.11	Pirimyphos methyl PD5	N.D.
Fenthion PD4	3643.51	Procymidone	1879.48
Kresoxin methyl	1968.83	Procymidone PD1	302.84
Kresoxin methyl PD1	N.D.	Propiconazole	1026.26
Kresoxin methyl PD2	N.D.	Propiconazole PD1	2126.62
Malathion	459.13	Propiconazole PD2	N.D.
Malathion PD1	187.81	Propiconazole PD3	1821.95
Malathion PD2	13.00	Propiconazole PD4	313.60
Methidathion	26.50	Propiconazole PD5	212.20
Norflurazone	1315.62	Propiconazole PD6	212.20
Norflurazone PD1	1023.11	Pyriproxifen	399.85
Oryzalin	5761.89	Pyriproxifen PD1	4806.03
Oryzalin PD1	7169.18	Pyriproxifen PD2	N.D.
Oryzalin PD2	777.03	Pyriproxifen PD3	1310.10
Oryzalin PD3	N.D.	Tebuconazole	2131.75
Oxyflourfen	2140.35	Tebuconazole PD1	2541.41
Oxyflourfen PD1	2227.78	Tebuconazole PD2	2541.41
Oxyflourfen PD2	1649.28	Tebuconazole PD3	2541.41
Oxyflourfen PD3	1391.72	Tebuconazole PD4	2084.30
Parathion ethyl	2140.35	Tebuconazole PD5	875.63
Parathion methyl	4.79	Thiabendazole	472.52
Parathion methyl PD1	5749.74	Thiabendazole PD1	N.D.
Pendimethalin	1776.37	Thiabendazole PD2	N.D.
Phosalone	259.48	Thiabendazole PD3	1104.08
Phosalone PD1	670.80	Thiabendazole PD4	N.D.
Trichlorfon	701.87		

N.D. No determinado

Podemos observar en la Tabla 5.2.10., que el PDs que presenta mayor toxicidad es el malathion PD2 con LD₅₀ de 13.00 mg/L, seguido del fenitrothion PD1 con LD₅₀ de 30.66

mg/L respectivamente. Ambos PDs proceden de la familia química de los organofosforados. En la Tabla 5.2.10., también se muestran que los PDs son más tóxicos que el compuesto originario en algunos casos como para el buprofezin, carbaryl, carfentrazone ethyl, chlorotoluron, fenitrothion, malathion, norflurozone, oryzalin, oxyflourfen, procymidone, propiconazole y tebuconazole.

En la Tabla 5.2.11., se muestran los PDs que no se degradan después de los 60 minutos de exposición a la luz UV. Cabe destacar que alguno de ellos presentaron valores de toxicidad relativamente elevados como el fenitrothion PD1.

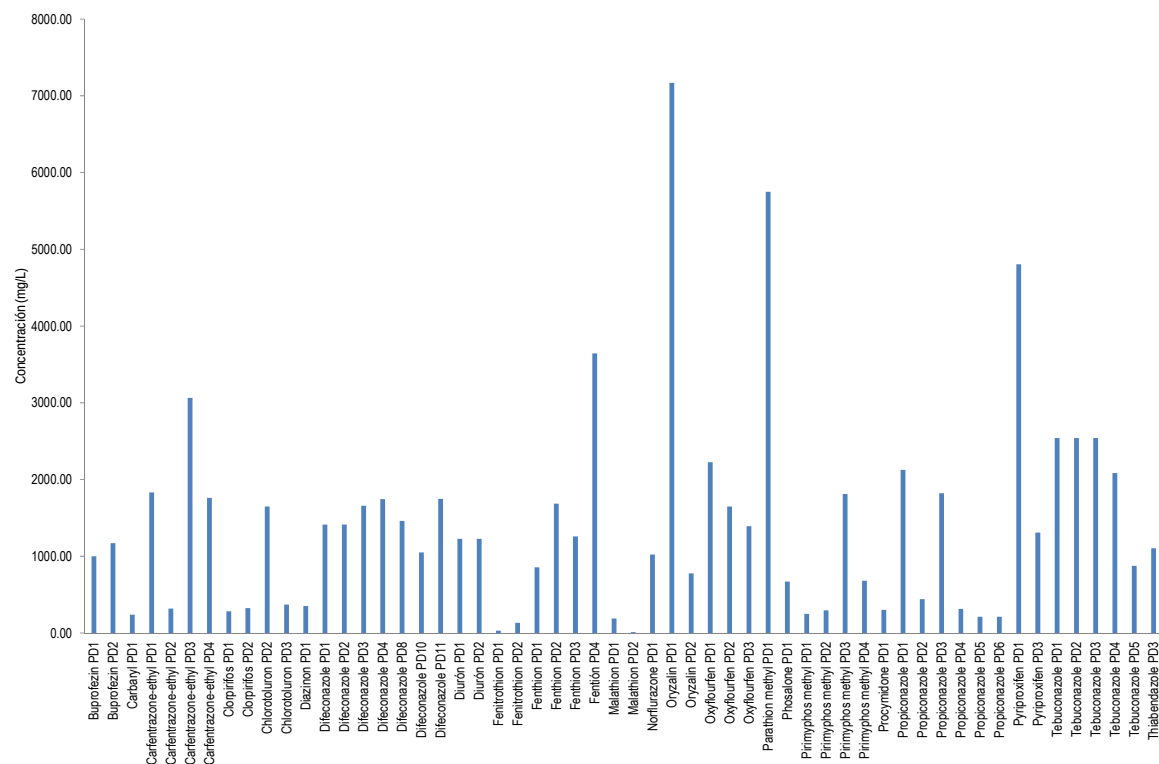


Figura 5.2.11. Toxicidad oral en ratas LD₅₀ (expresada en mg/L) para los plaguicidas y sus PDs.

Tabla 5.2.11. Predicción de toxicidad para los productos de degradación que no se degradan después de los 60 minutos de exposición UV.

<i>Producto degradación</i>	<i>Oral rata LD₅₀ (mg/L)</i>	<i>Producto degradación</i>	<i>Oral en ratas LD₅₀ (mg/L)</i>
Carfentrazone-ethyl PD1	1832.72	Parathion methyl PD1	5749.74
Carfentrazone-ethyl PD3	3065.12	Pirimyphos methyl PD1	249.83
Carfentrazone-ethyl PD4	1760.52	Pirimyphos methyl PD3	1811.19
Difeconazole PD1	1413.65	Pirimyphos methyl PD4	682.23
Difeconazole PD2	1413.65	Pirimyphos methyl PD5	N.D.
Difeconazole PD3	1658.22	Propiconazole PD1	2126.62
Fenitrothion PD1	30.66	Propiconazole PD2	N.D.
Fenitrothion PD2	132.53	Propiconazole PD3	1821.95
Fenthion PD4	3643.51	Propiconazole PD5	212.20
Norflurazone PD1	1023.11	Tebuconazole PD5	875.63
Oryzalin PD1	7169.18	Thiabendazole PD1	N.D.
Oryzalin PD2	777.03	Thiabendazole PD2	N.D.
Oryzalin PD3	N.D.	Thiabendazole PD3	1104.08
Oxyflourfen PD1	2227.78	Thiabendazole PD4	N.D.
Oxyflourfen PD3	1391.72		

5.2.3.6. Identificación de plaguicidas en aceite de oliva virgen

Para la identificación de los plaguicidas en los experimentos de tratamiento con UV en aceite de oliva, se obtuvieron las medidas de masa exacta y los tiempos de retención de los plaguicidas a partir de patrones de concentración conocida. En la Tabla 5.2.12. y 5.2.13, se muestran los parámetros empleados para la identificación y confirmación de los plaguicidas estudiados en los experimentos UV en aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 y 0.20 mg/Kg. Como se puede observar, la exactitud de la masa es buena, con errores menores a 2 ppm (error de masa relativa) en la mayoría de los casos.

Tabla 5.2.12. Parámetros empleados para la identificación de los plaguicidas estudiados en los experimentos UV en aceite de oliva virgen mediante LC-TOFMS: composición elemental, tiempo de retención (t_R), medidas de masa exacta y error de masa relativo expresado en ppm.

	Compuesto	Composición elemental	t_R	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)
1	Amitrol	C ₂ H ₄ N ₄	0.932	85.0509	85.0514	-
2	Buprofezin	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	8.637	306.1659	306.1632	0.74
3	Carbaryl	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	8.477	202.0863	202.0862	0.50
4	Carfentrazone-ethyl	C ₁₅ H ₁₄ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₃	7.369	412.0437	412.0434	0.56
5	Chlorpyrifos ethyl	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	9.118	349.9336	349.9333	1.81
6	Chlorpyrifos methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	6.197	321.9023	321.9024	0.65
7	Chlorotoluron	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	5.892	213.0789	213.0786	1.55
8	Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	8.011	305.1085	305.1085	0.69
9	Difeconazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	7.529	406.072	406.0719	0.11
10	Disflufenican	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	8.123	395.0813	395.0812	0.27
11	Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	5.266	230.0069	230.0055	6.29
12	Diurón	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	6.062	233.0249	233.0541	0.81
13	Fenitrothion	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	7.015	278.0247	278.0244	0.91
14	Fenoxycarb	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	6.967	302.1387	302.1386	1.02
15	Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	7.625	279.0273	279.0269	1.34
16	Kresoxin methyl	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	7.368	314.1387	314.1399	0.43
17	Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	6.999	331.0433	331.0435	0.59
18	Methidathion ^a	NaC ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	3.833	324.9511	324.9513	0.73
19	Norflurazone	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O	6.052	304.0459	304.0456	1.11
20	Oryzalin	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₆ S	6.935	347.102	347.1017	0.92
21	Oxadiazon	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	9.022	345.0767	345.0762	1.53
22	Oxyflourfen	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	22.435	362.0401	362.0407	1.43
23	Parathion ethyl	C ₁₀ H ₁₄ O ₅ PS	7.593	292.0403	292.0403	0.17
24	Parathion methyl	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	4.876	264.0090	264.0093	0.11
25	Pendimethalin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	23.489	282.1448	282.1448	0.01
26	Phosalone	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	7.995	367.9941	367.9945	0.81
27	Phosmet	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	8.572	318.0018	318.0056	0.19
28	Pirimyphos methyl	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	8.197	306.1036	306.1038	0.83
29	Procymidone	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	7.192	284.024	284.0239	0.06
30	Propiconazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	9.678	342.0771	342.0769	0.48
31	Pyriproxifen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	8.958	322.1438	322.1436	0.38
32	Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	6.887	308.1524	308.1524	0.01
33	Thiabendazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	4.429	202.0433	202.0438	2.09
34	Trichlorfon	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	3.241	256.9299	256.8886	1.60

^a aductos de sodio

Tabla 5.2.13. Parámetros empleados para la identificación de los plaguicidas estudiados en los experimentos UV en aceite de oliva virgen mediante GC-MS/MS: tiempo de retención (t_R), transiciones MS/MS para identificación, confirmación y cuantificación, con sus energías de colisión óptimas.

	Compuesto	Composición elemental	t_R	Q (EC,v)	q1 (EC,v)	q2 (EC,v)
1	α -cypermethrin	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	34.627	163.0>90.9(15)	163.0>126.9(10)	181.0>152.1(25)
2	α - endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	24.075	338.8>160.1(15)	338.8>194.9(10)	338.8>230.9(10)
3	β -endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	26.318	338.8>266.7(10)	338.8>160.0(15)	338.8>230.8(10)
4	Endosulfan sulfate	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	27.707	386.8>252.9(10)	386.8>288.9(10)	386.8>205.7(35)
5	Deltamethrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	37.580	252.9>93.0(20)	252.9>174.0(10)	252.9>90.9(25)

(EC,v) = Energía de colisión

Q, q1 y q2= transiciones

5.2.3.7. Comportamiento y estudio de degradación de los plaguicidas en aceite de oliva virgen

Los ensayos de la degradación se desarrollaron, exponiendo las muestras de aceite de oliva con los plaguicidas fortificados a la radiación ultravioleta durante 150 minutos y tomando muestras a distintos intervalos de tiempo para cada experimento. A continuación, se muestran y discuten los resultados para cada uno de los compuestos estudiados. La Tabla 5.2.14. y la Figura 5.2.12. muestran el comportamiento y degradación de los plaguicidas estudiados en aceite de oliva virgen.

El 51% de los plaguicidas ensayados se degradan prácticamente por completo a los 150 minutos de exposición, presentando un porcentaje de degradación de 90 a 100%. Por otra parte, los que presentan menor degradación son el α -cipermetryn, α -endosulfan, β -endosulfan y endosulfan sulfate con degradaciones menores al 50%. En el estudio realizado por Martínez y col. [235] , a los 150 minutos y a temperatura máxima de 30°C, no consiguieron la degradación completa de la mayoría de los plaguicidas ensayados en aceite de oliva.

Tabla 5.2.14. Porcentaje de degradación de los plaguicidas estudiados en aceite de oliva, en función al tiempo de exposición a la radiación ultravioleta y al nivel de fortificación.

	Plaguicidas	Nivel de fortificado (mg/Kg)	Tiempo de exposición UV (minutos)						
			0	10	30	60	90	120	150
1	α -cypermethrin	5.00	0.00	5.26	12.70	19.23	30.36	38.83	45.10
2	Amitrol	0.20	0.00	9.98	57.8	83.47	91.75	97.36	100.00
3	Buprofezin	5.00	0.00	8.65	31.57	67.11	84.42	93.17	97.08
4	Carbaryl	5.00	0.00	10.2	16.80	26.33	38.49	49.76	57.45
5	Carfentrazone-ethyl	0.20	0.00	12.75	30.60	58.42	75.60	87.70	93.51
6	Chlorpyrifos ethyl	5.00	0.00	18.69	69.08	95.56	100.00	100.00	100.00
7	Chlorpyrifos methyl	5.00	0.00	13.21	70.14	93.52	100.00	100.00	100.00
8	Chlorotoluron	5.00	0.00	6.85	43.40	70.22	85.62	94.42	97.64
9	α - endosulfan	5.00	0.00	5.21	14.15	20.68	30.16	39.64	45.75
10	β - endosulfan	5.00	0.00	6.28	16.07	24.50	31.30	40.03	47.39
11	Endosulfan sulfate	5.00	0.00	8.20	13.95	24.69	32.85	38.91	46.94
12	Deltamethrin	0.20	0.00	12.00	24.76	46.85	56.11	65.05	71.42
13	Diazinon	0.20	0.00	7.55	16.33	26.51	34.97	42.2	50.98
14	Difeconazole	5.00	0.00	14.22	40.16	76.35	88.29	95.66	98.56
15	Diflufenican	5.00	0.00	10.44	28.61	63.50	78.86	88.36	94.74
16	Dimethoate	5.00	0.00	5.83	31.38	61.03	74.75	79.86	87.43
17	Diurón	5.00	0.00	2.11	39.34	70.69	82.63	91.54	96.50
18	Fenitrothion	5.00	0.00	15.19	23.91	49.23	65.26	77.52	84.17
19	Fenoxycarb	5.00	0.00	6.74	21.64	40.99	61.48	74.80	82.17
20	Fenthion	5.00	0.00	14.19	27.53	55.83	75.61	85.22	92.01
21	Kresoxin methyl	5.00	0.00	5.32	25.75	51.04	67.23	79.96	88.87
22	Malathion	5.00	0.00	0.49	23.17	39.81	59.94	71.39	78.65
23	Methidathion	5.00	0.00	3.98	12.18	25.41	38.04	46.72	59.08
24	Norflurazone	5.00	0.00	32.93	87.58	100.00	100.00	100.00	100.00
25	Oryzalin	5.00	0.00	11.86	30.42	54.81	73.17	82.17	90.66
26	Oxadiazon	5.00	0.00	14.75	43.19	72.89	87.91	94.81	98.42
27	Oxyflourfen	5.00	0.00	23.80	69.38	92.76	100.00	100.00	100.00
28	Parathion ethyl	5.00	0.00	15.92	47.20	73.30	89.12	94.97	97.87
29	Parathion methyl	5.00	0.00	16.20	36.54	53.77	67.16	74.18	83.48
30	Pendimethalin	5.00	0.00	21.91	67.71	93.98	100.00	100.00	100.00
31	Phosalone	5.00	0.00	6.88	39.49	65.72	79.92	90.51	95.87
32	Phosmet	5.00	0.00	15.63	23.85	37.36	49.46	60.72	67.85
33	Pirimyphos methyl	5.00	0.00	9.76	19.55	31.08	41.29	49.30	61.29
34	Procymidone	5.00	0.00	5.97	15.09	25.04	38.50	54.26	61.37
35	Propiconazole	5.00	0.00	5.93	44.46	82.20	90.53	96.57	100.00
36	Pyriproxifen	5.00	0.00	4.79	35.26	61.53	77.95	89.17	94.94
37	Tebuconazole	5.00	0.00	8.81	23.89	32.21	42.97	52.84	59.01
38	Thiabendazole	5.00	0.00	15.72	51.13	78.23	91.46	97.33	100.00
39	Trichlorfon	0.20	0.00	6.46	11.70	25.68	32.77	43.24	50.67

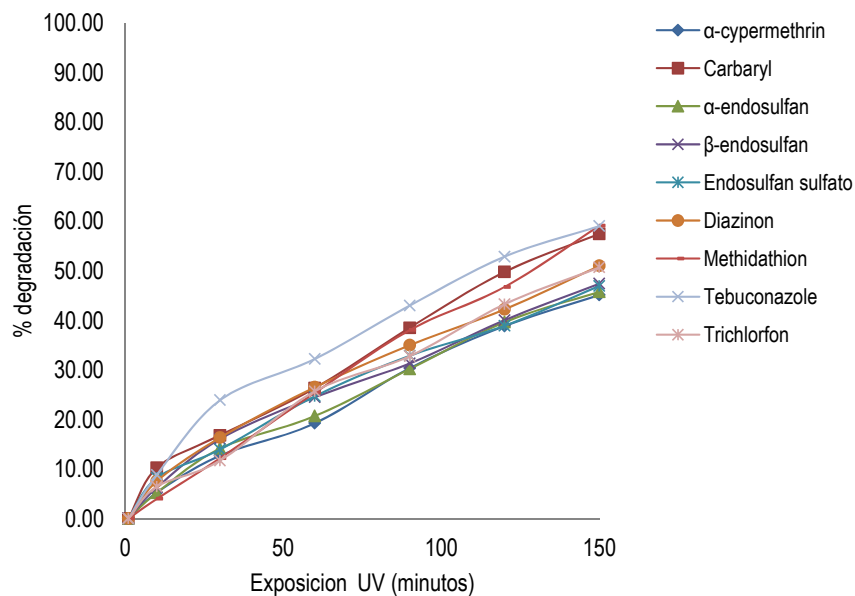


Figura 5.2.12. Curvas de degradación de los plaguicidas en aceite de oliva, representa el tiempo de exposición frente al porcentaje de degradación.

5.2.3.8. Estudio de la cinética de degradación de los plaguicidas estudiados

Se representó el logaritmo neperiano del porcentaje de degradación de los plaguicidas ensayados frente al tiempo de exposición. Los resultados se muestran en la Figura 5.2.13. Bajo las condiciones estudiadas en este trabajo, la degradación de los plaguicidas presentan un comportamiento cinético de primer orden, tanto para los aceites fortificados a 5 y 0.20 mg/Kg.

a)

b)

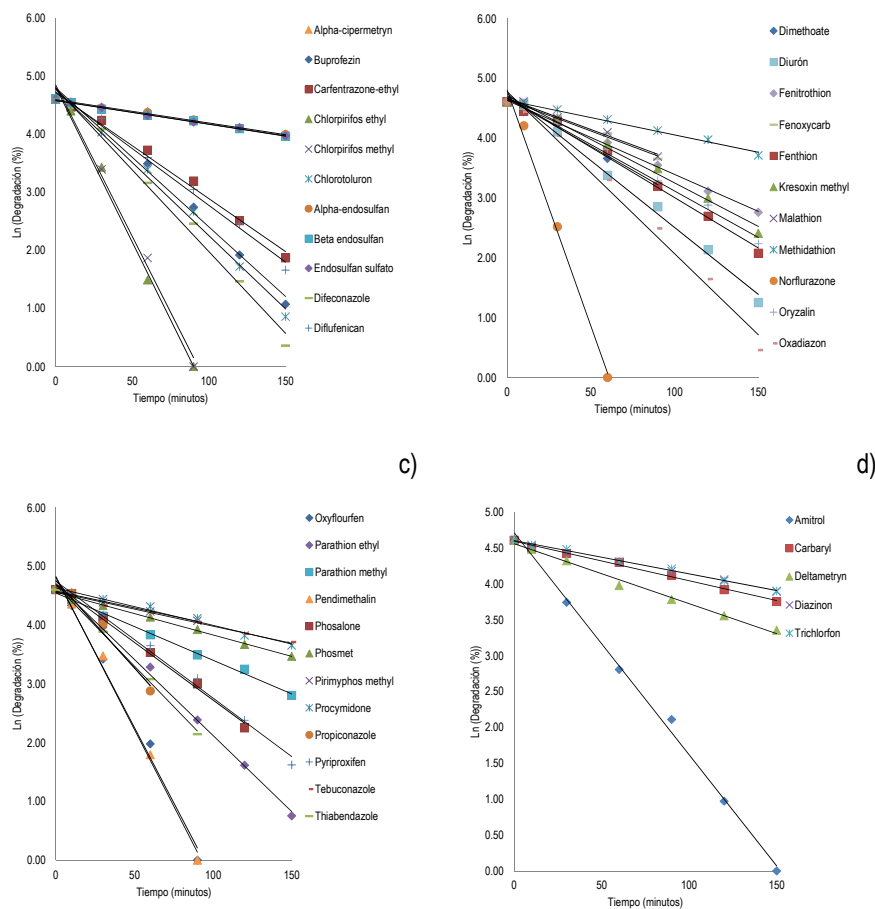


Figura 5.2.13. Demostración del comportamiento cinético de primer orden para la degradación de los plaguicidas ensayados: a), b) y c) aceite de oliva fortificado a 5 mg/Kg y d) fortificado a 0.20 mg/kg.

A partir de las pendientes de las rectas obtenidas del ajuste por mínimos cuadrados se calcularon las constantes de velocidad y los tiempos de vida media. Ambos datos juntos con los coeficientes de regresión (R^2) correspondientes a los ajustes lineales mostrados en la Figuras 5.2.13 se han incluido en la Tabla 5.2.15.

Tabla 5.2.15. Parámetros cinéticos de la degradación de plaguicidas en aceite de oliva virgen.

	Plaguicidas	Coficiente de regresión (R^2)	Rango evaluado (min)	K (min^{-1}) $\times 10^3$	$t_{1/2}$ (min)
1	α -cypermethrin	0.9960	0-150	0.40	173.25
2	Amitrol	0.9965	0-150	3.08	22.50
3	Buprofezin	0.9905	0-150	2.39	29.00
4	Carbaryl	0.9930	0-150	0.55	126.00
5	Carfentrazone-ethyl	0.9908	0-150	1.82	38.08
6	Chlorpyrifos ethyl	0.9924	0-90	5.34	12.98
7	Chlorpyrifos methyl	0.9909	0-90	5.22	13.28
8	Chlorotoluron	0.9927	0-150	2.52	27.50
9	α - endosulfan	0.9959	0-150	0.40	173.25
10	β -endosulfan	0.9944	0-150	0.41	169.02
11	Endosulfan sulfate	0.9947	0-150	0.40	173.25
12	Deltamethrin	0.9910	0-150	0.83	83.49
13	Diazinon	0.9960	0-150	0.45	154.00
14	Difeconazole	0.9904	0-150	2.81	24.66
15	Diffufenican	0.9914	0-150	1.95	35.54
16	Dimethoate	0.9900	0-150	1.41	49.15
17	Diurón	0.9934	0-150	2.24	30.94
18	Fenitrothion	0.9953	0-150	1.24	55.89
19	Fenoxycarb	0.9918	0-150	1.18	58.73
20	Fenthion	0.9925	0-150	1.68	41.25
21	Kresoxin methyl	0.9908	0-150	1.45	47.79
22	Malathion	0.9944	0-150	1.08	64.17
23	Methidathion	0.9906	0-150	0.58	119.48
24	Norflurazone	0.9933	0-60	7.89	8.78
25	Oryzalin	0.9938	0-150	1.55	44.71
26	Oxadiazon	0.9886	0-150	2.71	25.57
27	Oxyflourfen	0.9887	0-90	5.11	13.56
28	Parathion ethyl	0.9974	0-150	2.58	26.86
	Plaguicidas	Coficiente de regresión (R^2)	Rango evaluado (min)	K (min^{-1}) $\times 10^3$	$t_{1/2}$ (min)

29	Parathion methyl	0.9944	0-150	1.14	60.79
30	Pendimethalin	0.9917	0-90	5.21	13.30
31	Phosalone	0.9915	0-150	2.10	33.00
32	Phosmet	0.9946	0-150	0.73	94.93
33	Pirimyphos methyl	0.9911	0-150	0.59	117.46
34	Procymidone	0.9850	0-150	0.64	108.28
35	Propiconazole	0.9915	0-150	3.07	22.57
36	Pyriproxifen	0.9911	0-150	1.99	34.82
37	Tebuconazole	0.9914	0-150	0.58	119.48
38	Thiabendazole	0.9944	0-150	3.10	22.35
39	Trichlorfon	0.9964	0-150	0.47	147.45

K: Constante de velocidad

$t_{1/2}$: Tiempo de vida media

De acuerdo con los resultados, los plaguicidas que más rápido se degradan en aceite de oliva son: norflurazone, chlorpirifos ethyl, chlorpirifos methyl, pendimethalin y oxyflourfen, mientras que los que menos se degradan son α -cipermetrin α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfate, diazinon y trichlorfon. También se puede observar que los $t_{1/2}$, son en general mucho mayores que en los ensayos en agua, presentando valores de 173 minutos, para el α -cipermetrin, α -endosulfan y endosulfan sulfato, 169 minutos el β -endosulfan y 154 minutos el diazinon. Los resultados de $t_{1/2}$, tanto en agua como en aceite nos confirman que los plaguicidas organoclorados son muy resistentes a la luz UV.

5.2.3.9. Estudio de los productos de degradación de los plaguicidas en aceite de oliva virgen

La identificación de los productos de degradación en el aceite de oliva se realizó teniendo en cuenta la coincidencia de los tiempos de retención con los correspondientes PDs encontrados en las disoluciones acuosas, junto con las medidas de masa exacta de las moléculas protonadas. En la Tabla 5.2.16. se muestran los resultados obtenidos incluyendo los PDs identificados en aceite de oliva en ensayos desarrollados con un nivel de fortificación de 5 mg/Kg.

Tabla 5.2.16. Identificación de los PDs de los plaguicidas ensayados en aceite de oliva virgen mediante LC-TOFMS. Nivel de fortificación: 5 mg/Kg.

	Productos de degradación	t_R (min)	Fórmula molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Oral rat LD ₅₀ (mg/L)
1	Kresoxin methyl PD2	8.511	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	206.0817	206.0829	0.0970	7	-
2	Pirimyphos methyl PD1	5.038	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₄ P	290.1263	290.1256	1.0340	4	249.83
3	Pirimyphos methyl PD2	5.247	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	278.0723	278.0806	1.7981	4	295.74
4	Pyriproxifen PD3	3.754	C ₈ H ₅ NO	96.0446	96.0448	2.0824	4	1310.10

Como se puede observar en la Tabla 5.2.16., cuatro de los ochenta y uno PDs encontrados en las disoluciones acuosas fueron identificados en aceite de oliva. Los PDs encontrados en el aceite de oliva presentan una toxicidad menor para el LD₅₀ a 212.20 mg/L. Por último cabe mencionar que todos los PDs identificados en aceite de oliva son menos tóxicos que los compuestos originarios. La Figura 5.2.14. muestra la identificación mediante LC-TOFMS del Kresoxim-methyl PD2, uno de los PDs detectados que fue confirmado a través de medidas de masa exacta.

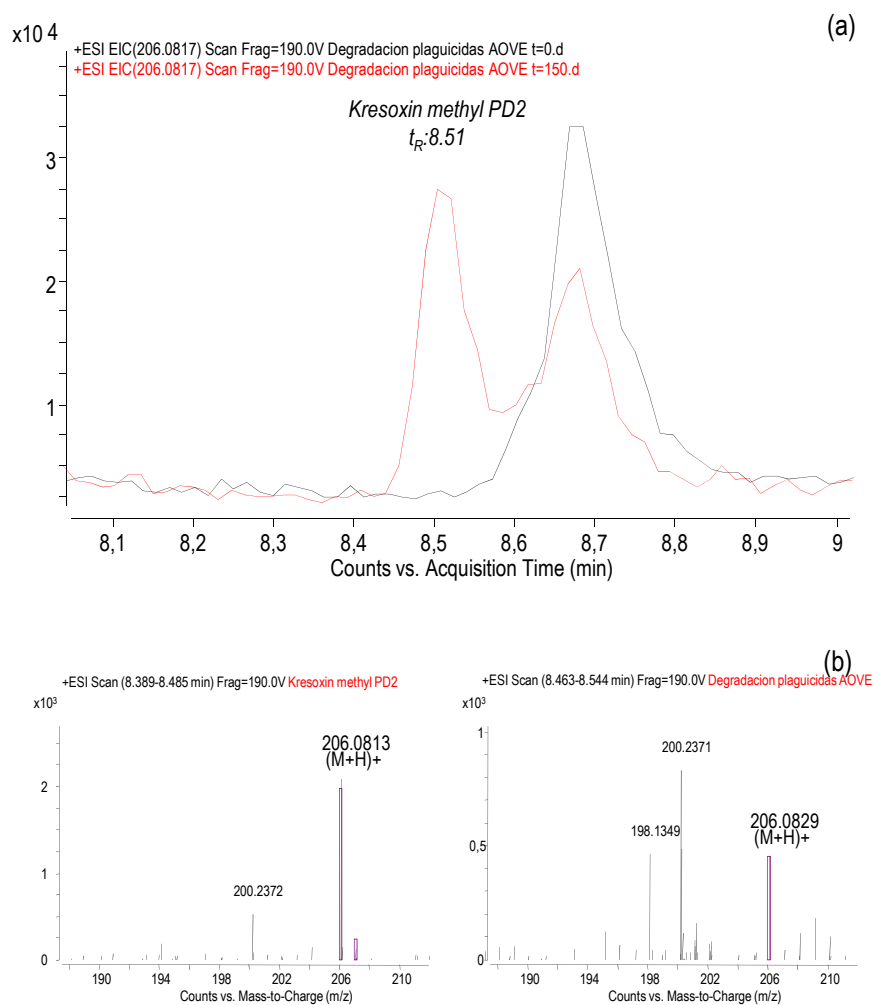


Figura 5.2.14. (a) Cromatogramas extraídos (EICs) del Kresoxim methyl PD2 a m/z 206.0813, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. (b) Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del Kresoxim methyl PD2 en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

La Figura 5.2.15 muestra el pirimiphos methyl PD1 encontrado en el aceite de oliva, que proviene de la oxidación del pirimiphos methyl oxon [110].

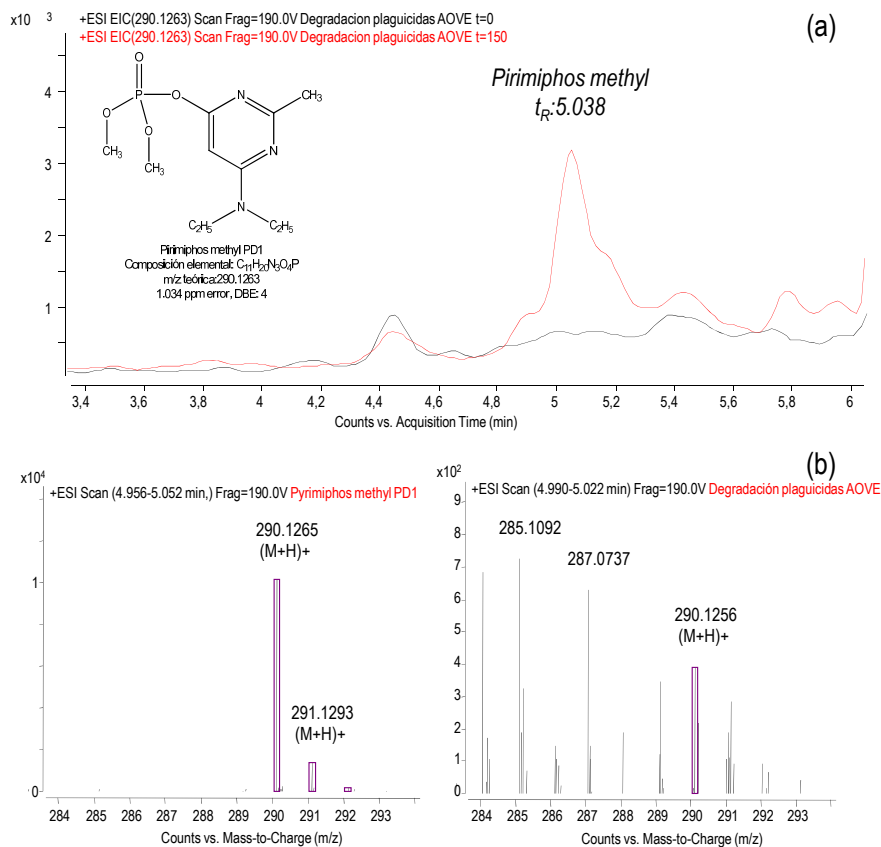


Figura 5.2.15. (a) Cromatogramas extraídos (EICs) del Pyrimiphos methyl PD1 a m/z 290.1265, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. (b) Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del Pyrimiphos methyl PD1 en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

En la Figura 5.2.16., se observa el pirimiphos methyl PD2, formado debido al proceso químico de *N-dealquilación*, que provoca la eliminación de un grupo etilo por la sustitución de un grupo etilo por un átomo de hidrógeno [110].

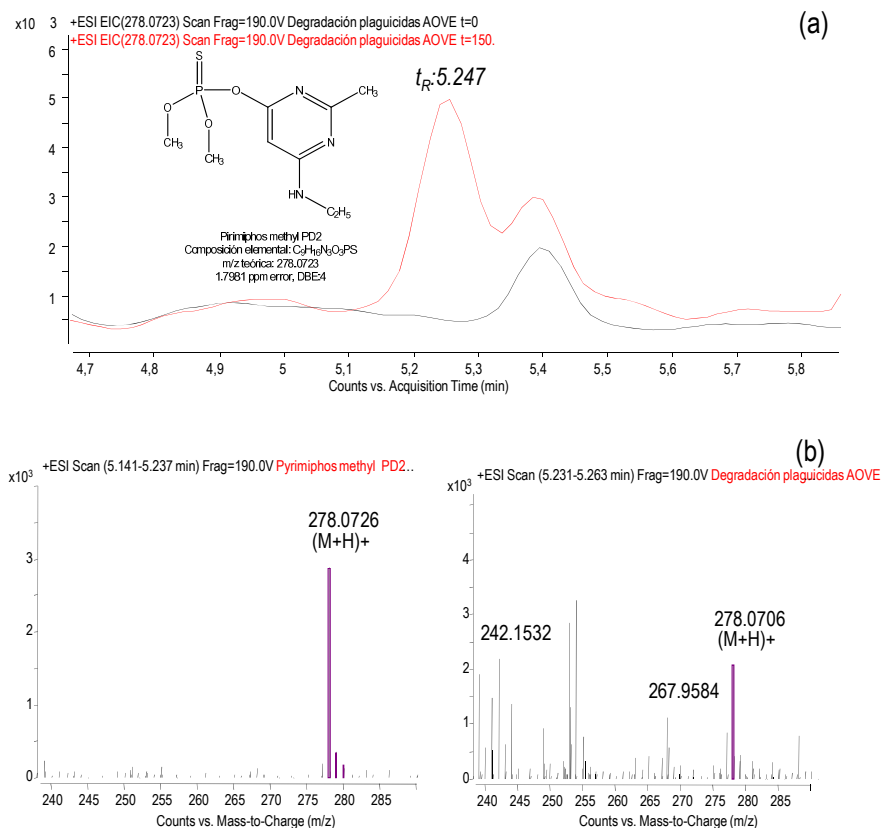


Figura 5.2.16. a). Cromatogramas extraídos (EICs) del Pyrimiphos methyl PD2 a m/z 278.0726, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del Pyrimiphos methyl PD2 en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

En la Figura 5.2.17, se muestran los cromatogramas EIC del piriproxyfen PD3 a tiempo 0 y a 150 minutos. Éste productos de transformación no había sido descrito anteriormente por otros autores.

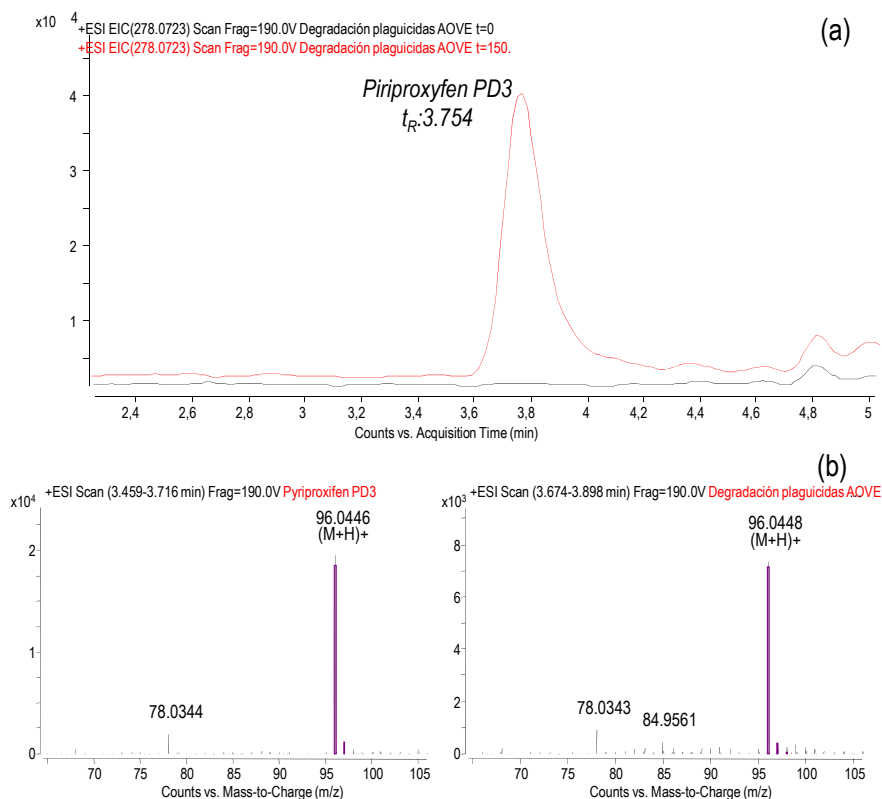


Figura 5.2.17. a). Cromatogramas extraídos (EICs) del Piriproxyfen PD3 a m/z 96.0446, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del Piriproxyfen PD3 en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

5.2.3.10. Comportamiento de los productos de degradación de los plaguicidas en estudio en aceite de oliva

En la Figura 5.2.18., se observa la evolución de los PDs y el porcentaje de degradación, de los PDs encontrados en el aceite de oliva virgen.

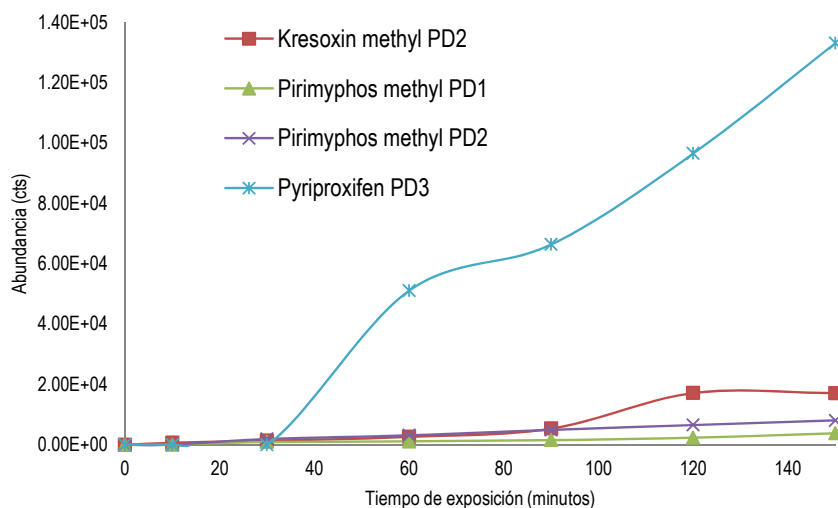


Figura 5.2.18. Comportamiento de los PDs de los plaguicidas encontradas en el aceite de oliva expuesto a la luz ultravioleta.

También se puede comprobar la evolución de los PDs. Al inicio del experimento (0 minutos) no se detecta su presencia, pero transcurrido un tiempo se van formando y alcanzan su máximo desarrollo a los 150 minutos, con una tendencia a seguir evolucionando.

5.2.3.11. Estudio comparativo de la degradación de los plaguicidas en aceite de oliva

En la Tabla 5.2.17., se ha comparado los resultados obtenidos en el presente trabajo con los estudios realizados por Martínez y col. [106, 235], que estudiaron la degradación de algunos de los plaguicidas a distintos niveles de concentración, tiempos de exposición a la radiación UV y diferentes temperaturas. En este estudio anterior, se obtuvieron porcentajes de degradaciones en el rango del 7-80%.

En el presente estudio, los niveles de fortificación fueron dos: 0.20 y 5.00 mg/Kg. El tiempo de exposición a la luz UV fue de 150 minutos, y se mantuvo la temperatura constante en todos los ensayos a 27°C, obteniéndose rangos de degradación del 45.10 al 100%.

La tabla muestra que se han incluido 19 nuevos plaguicidas empleados en el olivar no estudiados anteriormente. El porcentaje de degradación promedio de los experimentos del presente estudio es superior al 80 % (81.4 %). Se puede decir que es un valor de degradación muy positivo considerando además la escasez de productos de degradación persistentes que se han encontrado en los ensayos en aceite de oliva virgen. El valor promedio de degradación encontrado en el presente estudio para los 39 plaguicidas es superior al descrito por Martínez y col. [235]. Una de las principales diferencias entre los dos estudios son los valores de temperatura que ejercen una influencia notable en las tasas de degradación de los plaguicidas.

Tabla 5.2.17. Tabla comparativa con los resultados obtenidos en la degradación de plaguicidas en aceite de oliva virgen.

	Plaguicidas	Martínez y col.[235]				Estudio realizado	
		Nivel de fortificado (mg/Kg)	t (min)	Temperatura (°C)	% degradación	Nivel de fortificado (mg/Kg)	t=150 (minutos)
1	α -cypermethrin	0.52	150	15	9.00	5.00	45.10
2	Amitrol					0.20	100.00
3	Buprofezin					5.00	97.08
4	Carbaryl	0.55	150	20	33.00	5.00	57.45
5	Carfentrazone-ethyl					0.20	93.51
6	Chlorpyrifos ethyl	1.98	150	20	68.70	5.00	100.00
7	Chlorpyrifos methyl					5.00	100.00
8	Chlorotoluron					5.00	97.64
9	α - endosulfan	2.02	16	20	11.40	5.00	45.75
10	β - endosulfan	1.43	150	15	0.70	5.00	47.39
11	Endosulfan sulfate	1.11	150	15	1.80	5.00	46.94
12	Deltamethrin	0.34	150	15	20.30	0.20	71.42
13	Diazinon					0.20	50.98
14	Difeconazole					5.00	98.56
15	Diflufenican	1.10	150	15	14.50	5.00	94.74
16	Dimethoate	1.50	150	20	48.40	5.00	87.43
17	Diurón	4.27	150	30	76.60	5.00	96.50
18	Fenitrothion	1.91	150	20	48.20	5.00	84.17
19	Fenoxycarb	1.16	150	30	13.00	5.00	82.17
20	Fenthion					5.00	92.01
21	Kresoxin methyl					5.00	88.87
22	Malathion	1.53	16	25	53.1	5.00	78.65
23	Methidathion	4.23	150	30	29.80	5.00	59.08
24	Norflurazone					5.00	100.00
25	Oryzalin					5.00	90.66
26	Oxadiazon					5.00	98.42
27	Oxyflourfen	1.53	150	15	44.50	5.00	100.00
28	Parathion ethyl	2.25	150	30	79.10	5.00	97.87
29	Parathion methyl	1.79	150	30	74.00	5.00	83.48
30	Pendimethalin					5.00	100.00
31	Phosalone					5.00	95.87
32	Phosmet	1.22	150	15	7.60	5.00	67.85
33	Pirimyphos methyl	1.80	16	20	20.5	5.00	61.29
34	Procymidone					5.00	61.37
35	Propiconazole					5.00	100.00
36	Pyriproxifen					5.00	94.94
37	Tebuconazole					5.00	59.01
38	Thiabendazole					5.00	100.00
39	Trichlorfon	2.58	150	20	78.1	0.20	50.67

5.2.4. Conclusiones

En este estudio se ha examinado la degradación mediante radiación con luz ultravioleta de 39 plaguicidas tanto en disoluciones acuosas como en aceite de oliva. A partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han degradado el 72% de los plaguicidas al término de los 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta en disoluciones acuosas. El comportamiento cinético de la degradación, presenta que el 87% de los mismos tienen un tiempo de vida media menor de 15 minutos.
- En el caso de los estudios en aceite de oliva, se encontró que un 61% de los plaguicidas estudiados presentaba un $t_{1/2}$ menor de 60 minutos. Sólo en el caso de 5 plaguicidas estos valores de $t_{1/2}$ eran superiores a 150 minutos (α -cipermetrin, α -endosulfan, endosulfan sulfate, β -endosulfan y diazinon).
- La aplicación de la técnica LC-TOFMS ha permitido la identificación de un elevado número de PDs de los plaguicidas en estudio, siendo un total de 74 PDs detectados de éstos, el 54% se degradan totalmente, y el 4% de los PDs formados tienen su máximo desarrollo a los 60 minutos, con lo que podemos decir que no se degradan con la luz ultravioleta y permanecían estables hasta el final del proceso. De los 74 PDs encontrados en este estudio, 27 de éstos ya eran descritos en otros trabajos de investigación de degradación de plaguicidas y 47 de los PDs son compuestos detectados por primera vez en esta investigación.
- De los PDs encontrados en las matrices acuosas sólo 4 de éstos se detectaron en el aceite de oliva fortificado, en el que presentaron comportamientos de permanencia después de los 150 minutos de exposición a la luz ultravioleta.
- Por este motivo, mediante el empleo de una herramienta *in silico* desarrollada por la US EPA (EE.UU), se han sometidos los PDs identificados a un análisis de toxicidad y se ha concluido que algunos de estos compuestos podrían ser más tóxicos que los plaguicidas de donde proceden.

5.3. Evaluación del tratamiento con radiación ultravioleta de triazinas en disoluciones acuosas y aceite de oliva virgen

Resumen

Las triazinas son herbicidas que se han empleado en el cultivo del olivar para el control de malezas en los suelos con la finalidad de optimizar la producción y rendimiento de la cosecha así como para facilitar la etapa de la recogida de aceituna. Debido a su persistencia y estabilidad química, el uso de derivados de triazinas presenta un riesgo potencial para los seres humanos y el medio ambiente. Por otra parte, la proliferación en el sector del olivar de sistemas de recolección económicamente más rentables, que están basados en la recogida de aceituna del suelo (mediante el uso de sopladoras, vibradoras, etc.), hace que la aceituna se recoja con gran parte de suelo, lo que facilita la contaminación de las aceitunas con residuos de plaguicidas, especialmente de herbicidas como las triazinas. Una solución para evitar la pérdida de partidas de aceite de oliva que estén contaminadas por algún producto fitosanitario es el empleo de técnicas de degradación/oxidación de estos compuestos, de forma que deseablemente mediante procesos físicos que no involucren la adición de sustancias químicas se pueden eliminar estos residuos de plaguicidas, que de lo contrario podrían impedir la comercialización del producto final (si no cumplen los límites establecidos) y también pueden dañar la imagen y percepción de calidad del producto.

En este trabajo, se ha estudiado la degradación ultravioleta de 10 derivados de las triazinas (ametryn, atrazine, cyanazine, desmetryn, dimethametryn, propazine, simazine, terbumeton, terbuthylazine y terbutryn), en matrices acuosas y en aceite de oliva, mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo empleando una fuente de ionización electrospray (LC-TOFMS). La degradación de triazinas se desarrolló en un reactor con una lámpara ultravioleta de presión media de Hg. Se investigaron las cinéticas de degradación de las triazinas y estimaron los correspondientes parámetros cinéticos (constantes de velocidad y tiempos de vida media). De las 10 triazinas en estudio, en el caso de los ensayos en agua, un 70 % de los mismos presentaba un valor de vida media $t_{1/2}$ (tiempo necesario para la degradación

del 50 % del producto) menor de 3 minutos. En el caso de los estudios en aceite de oliva, se encontró que un 50 % de los plaguicidas estudiados presentaba un $t_{1/2}$ menor de 120 minutos.

Además de la monitorización de la degradación de los plaguicidas también se identificaron 63 productos de degradación (PDs), en agua, que fueron investigados en el aceite identificándose seis productos de degradación, mediante LC-TOFMS.

5.3.1. Introducción

La familia de herbicidas de las triazinas es una de las más conocidas y utilizadas de los últimos 50 años. Su actividad herbicida fue descubierta en 1952 por Geigy en Suiza, y desde ese momento se desarrollaron muchas variantes y derivados de esta familia [269]. Las triazinas son los herbicidas más utilizados para el control de hoja ancha y gramíneas. Químicamente son anillos de seis miembros que contienen tres nitrógenos y un anillo que contiene nitrógeno (azina) formando los nitrógenos heterocíclicos. La mayoría de las triazinas comerciales son simétricas y de baja solubilidad en agua [270].

La disipación de las triazinas en el medio ambiente pueden incluir los siguientes procesos: la degradación química o microbiana en el suelo, metabolismo o conjugación en plantas, fotodegradación en aire, el agua, plantas y suelos, y los mecanismos de volatilización y transporte. La degradación por la luz es uno de los principales procesos de degradación de las triazinas en el medio ambiente [271]. Según las investigaciones realizadas [272], la degradación de la atrazina, mediante radiación ultravioleta es relativamente compleja, y puede seguir varios caminos de reacción que incluyen desalquilación, dechloración, oxidación alquímica, hidroxilación y combinaciones de varios de los procesos anteriores [273].

En la actualidad se están estudiando varios métodos de oxidación avanzados para la eliminación de las triazinas, como métodos fotocatalíticos con partículas de TiO_2 y luz solar [137, 274], fotólisis UV en procesos de oxidación avanzada (usando también peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio) [275], $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ [276], UV/O_3 [277] o UV/TiO_2 [278].

La metodologías analíticas empleadas para la determinación de las triazinas y sus principales productos de transformación son las técnicas de separación cromatográficas, principalmente cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS) [210, 273, 279], cromatografía de gases con un capilar columna y detector de masas (CG-MS/MS) [235,

280], así como el acoplamiento directo entre cromatografía de líquidos en fase inversa y cromatografía de gases (RPLC-GC) utilizando diferentes detectores [119].

En este trabajo, se ha estudiado la degradación por tratamiento con radiación UV de 10 triazinas (ametryn, atrazine, cyanazine, desmetryn, dimethametryn, propazine, simazine, terbumeton, terbutylazine y terbutryn), tanto en matrices acuosas como en aceite de oliva virgen, mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOFMS). La degradación de triazinas se desarrolló en un reactor con una lámpara ultravioleta de presión media de Hg y el análisis de la triazinas y sus productos de degradación con LC-TOFMS. Se investigaron las cinéticas de degradación de las triazinas y estimaron los correspondientes parámetros cinéticos (constantes de velocidad y tiempos de vida media). Además de la monitorización de la degradación de los plaguicidas también se estudió e identificaron los principales productos de degradación (PDs) generados tanto en el estudio en agua como en aceite.

5.3.2. Experimental

5.3.2.1. Patrones

Los patrones de las triazinas, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España. Se prepararon disoluciones concentradas de (1000 a 5000 $\mu\text{g/mL}$) para cada triazina (Figura 5.3.1 y Tabla 5.3.1) en metanol y se almacenaron en el congelador (-20°C). Se preparó una disolución mezcla de patrones de 1 mg/L , empleando como disolvente una mezcla al 20% de metanol/agua para optimizar la separación e identificación de las triazinas estudiadas mediante LC-TOFMS.

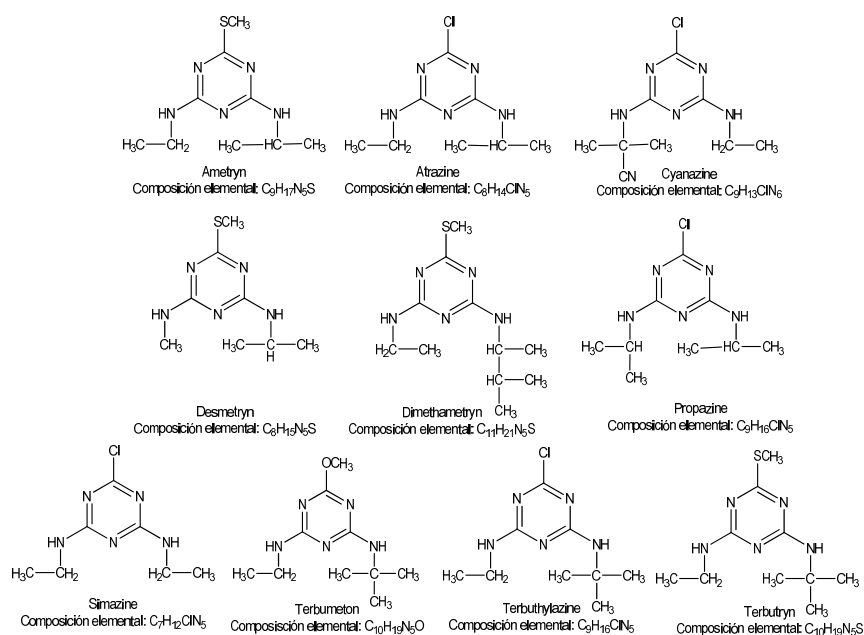
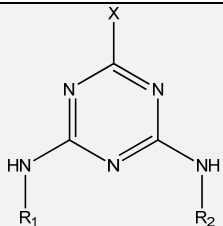


Figura 5.3.1. Nombre y estructura molecular de las 10 triazinas incluidas en el estudio.

Tabla 5.3.1. Fórmula General y grupos sustituibles de los derivados de las triazinas.

				
	Nombre	X	R ₁	R ₂
1	Ametryn	SCH ₃	C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂
2	Atrazine	Cl	C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂
3	Cyanazine	Cl	C ₂ H ₅	C(CH ₃) ₂ CN
4	Desmetryn	SCH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
5	Dimethametryn	SCH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ (CH ₃) ₃
6	Propazine	Cl	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
7	Simazine	Cl	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
8	Terbumeton	OCH ₃	C ₂ H ₅	C(CH ₃) ₃
9	Terbutylazine	Cl	C ₂ H ₅	C(CH ₃) ₃
10	Terbuthryn	SCH ₃	C ₂ H ₅	C(CH ₃) ₃

5.3.2.2. Equipo para radiación ultravioleta

Los experimentos se llevaron a cabo en el reactor descrito en detalle en el apartado 4. La lámpara ultravioleta se encontraba inmersa en el reactor donde se añadían 500 mL de las disoluciones. Se añadió un termómetro en el interior del reactor para indicar la temperatura de la disolución. El montaje empleado se muestra esquemáticamente en la Figura 5.3.2.

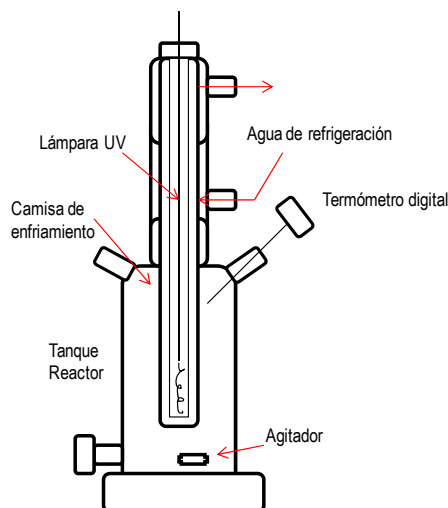


Figura 5.3.2. Diagrama del montaje del equipo empleado para llevar a cabo los estudios de degradación UV.

5.3.2.3. Extracción en fase sólida para el análisis en disoluciones acuosas

Se utilizó un método de SPE con cartucho HLB, con el fin de aislar y preconcentrar el mayor número de productos de degradación de las triazinas (Figura 5.3.3.). La extracción consiste en pasar una alícuota de 4 mL la muestra objeto de estudio a través del cartucho SPE (previamente acondicionado con 4 mL de metanol y 4 mL agua MilliQ). Se realiza el lavado del cartucho con 4 mL de metanol al 5%. Luego se realiza la elución de los compuestos retenidos con 4 mL de metanol (x 2 veces). El volumen final se evapora bajo corriente de nitrógeno a 35°C y el residuo se reconstituye en 1.0 mL (0.2 mL de metanol y 0.8 mL de agua Milli-Q), se filtra a través de un filtro de 0.45 μm , y finalmente se trasvasa a un vial de vidrio de 2 mL, hasta su inyección en el LC-TOFMS.

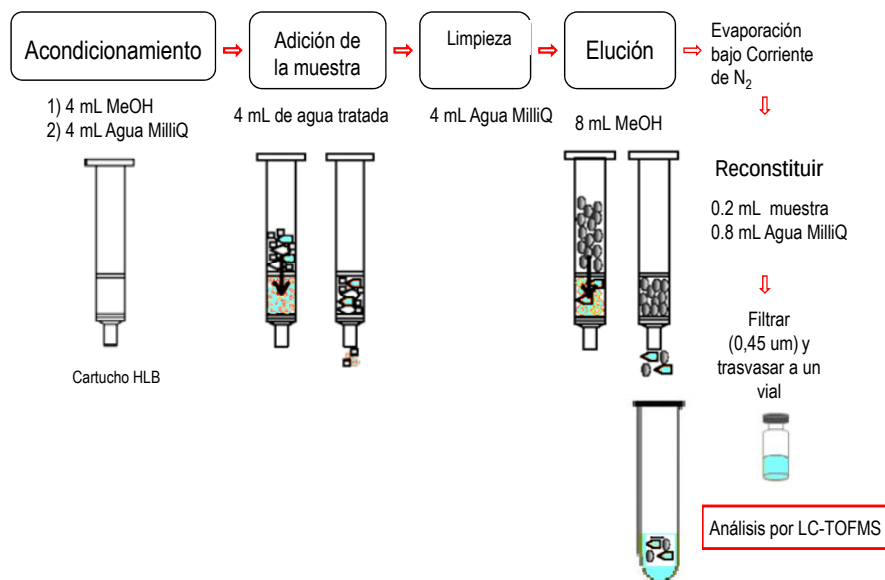


Figura 5.3.3. Esquema del método de SPE, empleado para la extracción de triazinas.

5.3.2.4. Estudio de degradación de las triazinas de partida en disoluciones acuosas

Los experimentos de degradación de las triazinas en disoluciones acuosas se realizaron a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Se llevaron a cabo experimentos de degradación en los que se tomaban 10 alícuotas para monitorizar el proceso. Éstas alícuotas (de 200 μL) se extrajeron del reactor a tiempo 0 (antes de la exposición). Una vez iniciado el experimento, se tomaban cada 5 minutos hasta los 30 minutos y a partir de entonces, se tomaban alícuotas cada 10 minutos para el resto de experimento. De esta forma, el volumen extraído era prácticamente despreciable frente al total del crudo de reacción (500 mL). Las alícuotas se diluían con 800 μL de agua ultra pura, antes de llevar a cabo el análisis mediante LC-TOFMS. Para facilitar la identificación de productos de degradación, también se realizaron experimentos recogiendo alícuotas de 4 mL, que eran procesadas empleando el método SPE descrito.

Para la monitorización de la degradación de las triazinas, se emplearon cromatogramas del ion extraído (EICs), correspondientes a la molécula protonada de la especie estudiada ($[M+H]^+$) con una ventana de extracción de masa de 20 mDa. Esta operación se llevaba a cabo para los distintos tiempos de exposición y los picos de cada uno de los EICs eran integrados, y su área representada frente al tiempo de exposición. La identificación, evaluación de los plaguicidas y sus PDs generados en el proceso de fotólisis por radiación ultravioleta, se realizó con la ayuda del programa MassHunter Qualitative Analysis, tal como se detalla en el capítulo 5.2. apartado 5.2.2.5.

5.3.2.5. Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo

El empleo de LC-TOFMS permitió llevar a cabo medidas de masas exactas de iones de interés, para confirmar o proponer fórmulas moleculares para los diferentes productos de degradación, aún en ausencia de estándares o biblioteca de espectros. El sistema LC-TOFMS empleando constaba de una bomba binaria HPLC Agilent Infinity 1290, equipada con desgasificador y muestreador automático. El sistema HPLC estaba a su vez conectado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent TOF 6220 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI) en modo de ionización positivo.

El método cromatográfico empleado consistió en un gradiente de elución con agua con 0.1% de ácido fórmico como disolvente A y acetonitrilo (de calidad LC-MS) como disolvente B. El método empezaba con un 10% de B, que se mantiene constante durante 3 min, seguido de un gradiente hasta el 80% de B hasta 22 minutos y un gradiente hasta 100% B en 25 minutos, composición que se mantenía constante durante 5 minutos más. Se incluyó al final una etapa de equilibrado de columna de 10 minutos después de cada análisis. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: la

columna analítica C₁₈ de 50 mm × 4.6 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C18); el flujo de la fase móvil de 0.5 mL/min; volumen de inyección de 2.0 µL. Condiciones del TOFMS, voltaje de capilar 4000V, gas de secado 9 L/min, temperatura del gas 325°C, presión del nebulizador 40 psi, voltaje de fragmentación 190 V, rango de m/z de 50 – 1000 Da.

5.3.2.6. Estudio del comportamiento de triazinas en aceite de oliva virgen

A) Degradación de plaguicidas en aceite de oliva mediante radiación UV

En un matraz de fondo plano se midieron aproximadamente 500 mL de aceite de oliva. A continuación se le añadió el volumen apropiado de la disolución concentrada que contenía las triazinas, de modo que la muestra quedase fortificada a un nivel de concentración de 5 mg/Kg (para el estudio de los PDs en el aceite de oliva) y de 0.020 mg/Kg (para el estudio de la degradación en condiciones de concentración similares a muestras reales). Después, la mezcla se agitó durante una hora para facilitar su homogeneización. Transcurrido ese tiempo, se dejó a temperatura ambiente durante una hora más. Para realizar el estudio de degradación de los plaguicidas, se tomaron 7 porciones de 3 g cada una del aceite de oliva fortificado a diferentes tiempos de exposición (0, 10, 30, 90, 120 y 150 minutos).

B) Preparación de muestra de aceite de oliva para análisis

Para la preparación de la muestra, se utilizó el método QuEChERS [126, 217]. El procedimiento propuesto para este estudio constaba de los siguientes pasos: una porción representativa de la muestra de 3 g fue pesada en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL de capacidad, junto con 7 mL de agua ultrapura (milli Q). A continuación, se añaden 10 mL de acetonitrilo (MeCN) y el tubo se agita vigorosamente durante 1 minuto. Después se añaden 4 g de sulfato de magnesio anhidro y 1 g de cloruro sódico (NaCl). Inmediatamente después (para evitar la coagulación del sulfato de

magnesio anhidro) el tubo se agita de nuevo enérgicamente durante 1 minuto y posteriormente la mezcla se centrifuga a 3700 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos. Una vez separadas las fases, se tomaron 5 mL del sobrenadante (extracto de acetonitrilo) que fueron transferidos a un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL de capacidad al que se habían añadido previamente 750 mg de MgSO_4 , 250 mg de PSA y 250 mg de C_{18} . El segundo tubo fue agitado durante 30 segundos y después se centrifugó a 3700 rpm durante 3 minutos. Un volumen de 3 mL de dicho extracto fue evaporado en un tubo de ensayo hasta casi sequedad bajo corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.2 mL de metanol (MeOH) y 0.8 mL de agua ultrapura. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de $0.45\ \mu\text{m}$ y transferido a un vial para su análisis. En la Figura 5.3.4., se puede ver un esquema de este procedimiento. Al objeto de conseguir muestras más limpias, los extractos para LC-TOFMS fueron diluidos 1:2 con agua ultrapura antes de su análisis (0.5 mL extracto + 0.5 mL disolución acuosa con un 20% MeOH), de forma que la muestra inyectada en el LC-MS contenía un 20% de MeOH y un 80% de agua.

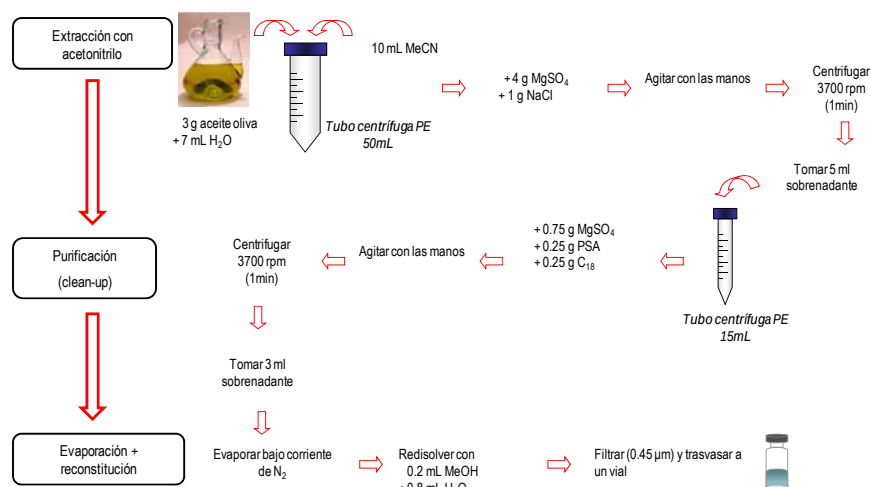


Figura 5.3.4. Esquema del protocolo QuEChERS utilizado para obtener los extractos de aceite.

C) Evaluación analítica de procesos de degradación e identificación de productos de degradación

El procedimiento de análisis de los experimentos de degradación, se realizó con la información obtenida con las reacciones de las disoluciones acuosas mediante LC-TOFMS y GC-MS/MS. Se procedió al estudio tanto de la degradación de los plaguicidas de partida como la identificación de productos de degradación (PDs) y su evolución con el tiempo. Estos estudios se llevaron a cabo de forma similar a la descrita en el apartado 5.2.2.6.

5.2.2.7. Predicción de toxicidad

Para la realización de la estimación de la toxicidad de cada PDs, se utilizó el *Toxicity Estimation Software Tool* (T.E.S.T.), que es un programa informático de la Agencia de Protección Ambiental (*United States Environmental Protection Agency*, EPA) [259], que se encuentra disponible en internet. Este software de predicción de toxicidad está basado en relaciones estructura/actividad (*Quantitative Structure Activity Relationships*, QSAR) del compuesto empleando diversos modelos matemáticos que se sintetizan en una fórmula como la mostrada en la Ecuación 5.2.1. Este programa informático tiene en cuenta una variedad de parámetros para predecir la toxicidad incluyendo propiedades físicas tales como el coeficiente de partición octanol/agua ($K_{O/W}$), la estructura molecular, el peso molecular o el número de anillos de benceno.

$$\text{Toxicidad} = ax_1 + bx_2 + c \quad (\text{Ecuación 5.2.1.})$$

X_1 y X_2 son variables independientes
 a , b , y c son parámetros de ajuste

5.3.3. Resultados y discusión

5.3.3.1. Identificación de las triazinas en disoluciones acuosas

La identificación y el estudio de la evolución de las triazinas se llevó a cabo empleando el método LC-TOFMS descrito en el apartado 5.3.2.5. La identificación de los compuestos se realizó a través de la medida de la masa de la molécula protonada ($[M+H]^+$), con el valor m/z característico del compuesto estudiado junto con el tiempo de retención (t_R). En la Tabla 5.3.2. se muestran los parámetros del método LC-TOFMS seleccionados para el estudio de degradación de las triazinas, incluyendo el tiempo de retención, composición elemental y valores de masa característicos de cada plaguicida. En la Figura 5.3.5., se muestran los cromatogramas LC-TOFMS de las diferentes triazinas con sus estructuras y espectros de masas respectivos.

Tabla 5.3.2. Identificación y confirmación de las triazinas estudiadas mediante LC-TOFMS: sus fragmentos, tiempos de retención, composición elemental, valores de masa, error experimental, DBE y referencias bibliográficas.

Triazinas y fragmentos	t_R (min)	Ion	Composición Elemental	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE
Ametryn	10.83	$[M+H]^+$	$C_9H_{17}N_5S$	228.1277	228.1277	1.02	4
		Frg 1	$C_6H_{11}N_5S$	186.0811	186.0808	1.57	4
		Frg 2	$C_5H_9N_3S$	144.0591	144.059	0.69	3
		Frg 3	$C_3H_5N_3S$	116.0277	116.0277	0.00	3
		Frg 4	$C_4H_5N_3$	96.0557	96.0556	0.38	4
		Frg 5	$C_3H_6N_2O_4$	68.0234	68.0237	2.09	2
Atrazine	13.27	$[M+H]^+$	$C_8H_{14}ClN_5$	216.1010	216.101	0.79	4
		Frg 1	$C_5H_8ClN_5$	174.0556	174.0541	0.36	4
		Frg 2	$C_3H_4ClN_5$	146.0223	146.0228	0.93	4
		Frg 3	$C_4H_6ClN_3$	132.0318	132.0323	4.55	3
		Frg 4	$C_4H_5N_3$	96.0553	96.0556	3.81	4
Cyanazine	11.68	$[M+H]^+$	$C_9H_{13}ClN_6$	241.0958	241.0863	2.03	6
		Frg 1	$C_8H_{13}ClN_5$	214.0850	214.0854	2.07	5
		Frg 2	$C_4H_6ClN_3$	132.0320	132.0323	2.14	3
		Frg 3	$C_4H_6N_3$	96.0556	96.0556	0.15	4
Desmetryn	9.038	$[M+H]^+$	$C_8H_{15}N_5S$	214.1120	214.1121	0.48	4
		Frg 1	$C_5H_9N_5S$	172.0651	172.0651	0.37	4
Dimethametryn	14.21	$[M+H]^+$	$C_{11}H_{21}N_5S$	256.1591	256.159	0.3	4
		Frg 2	$C_6H_{11}N_5S$	186.0809	186.0808	0.38	4
Propazine	15.26	$[M+H]^+$	$C_9H_{16}ClN_5$	230.1165	230.1167	0.79	4
		Frg 1	$C_6H_{10}ClN_5$	188.0696	188.0697	0.97	4
		Frg 2	$C_3H_4ClN_5$	146.0228	146.0227	0.87	4
Simazine	11.07	$[M+H]^+$	$C_7H_{12}ClN_5$	202.0854	202.0854	0.22	4
		Frg 1	$C_5H_8ClN_5$	174.0543	174.0541	1.37	4
		Frg 2	$C_3H_4ClN_5$	146.0231	146.0228	2.05	4
Terbumeton	9.489	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{19}N_5O$	226.1665	226.1662	1.3	4
		Frg 1	$C_6H_{11}N_5O$	170.1038	170.1036	1.03	4
		Frg 2	$C_4H_7N_5O$	142.0725	142.0652	0.83	4

Triazinas y fragmentos	t.R. (min)	Ion	Composición Elemental	[M+H] ⁺ m/z teórica	[M+H] ⁺ m/z experimental	Error (ppm)	DBE
		Frg 3	C ₅ H ₉ N ₃ O	128.0820	128.0818	1.19	3
		Frg 4	C ₄ H ₇ N ₃ O	114.0665	114.0662	3.09	3
		Frg 5	C ₃ H ₅ N ₃ O	100.0510	100.0505	4.39	3
		Frg 6	C ₄ H ₅ N ₃	96.0559	96.0556	3.27	4
Terbutylazine	15.79	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.1168	230.1167	0.56	4
		Frg 1	C ₅ H ₈ ClN ₅	174.0539	174.0541	0.97	4
		Frg 2	C ₃ H ₄ ClN ₅	146.0236	146.0228	5.33	4
		Frg 3	C ₄ H ₆ ClN ₃	132.0332	132.0323	6.64	3
Terbutryn	12.86	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	242.1436	242.1434	0.87	4
		Frg 1	C ₆ H ₁₁ N ₅ S	186.0809	186.0808	0.39	4
		Frg 2	C ₄ H ₇ N ₅ S	158.0493	158.0495	1.20	4
		Frg 3	C ₅ H ₉ N ₃ S	116.0278	116.0277	0.86	3

[M+H]⁺: Molécula protonada

Frg.: Fragmento

Error: diferencia entre m/z experimental y m/z teórica (de la composición elemental asignada). Expresado en ppm.

DBE: Número equivalente de dobles enlaces y anillos

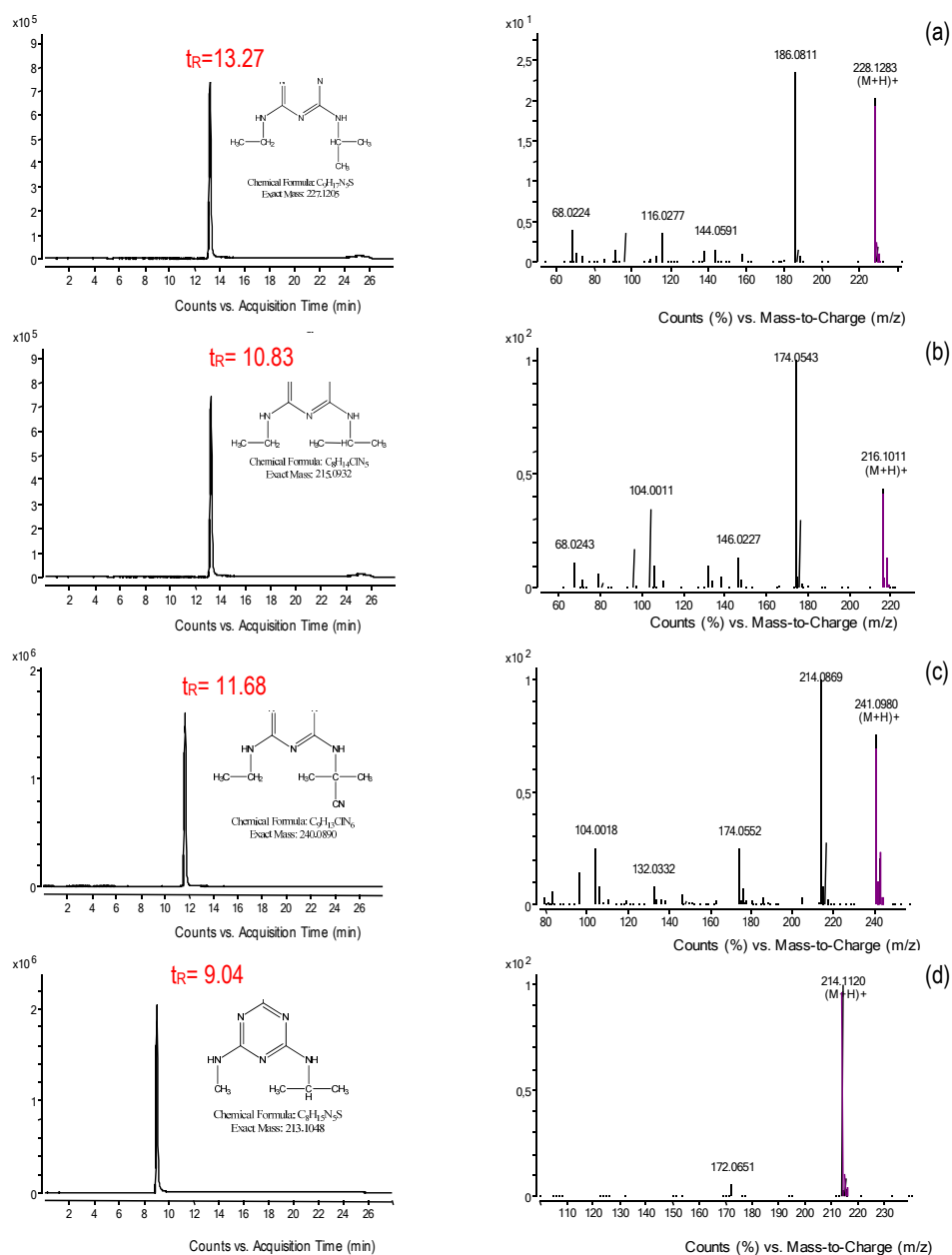


Figura 5.3.5. a) Cromatogramas de iones extraídos ($[M+H]^+$) (izquierda) y espectro de masas (derecha) de las triazinas estudiadas: (a) ametryn; (b) atrazine, (c) cyanazine, (d) desmetryn.

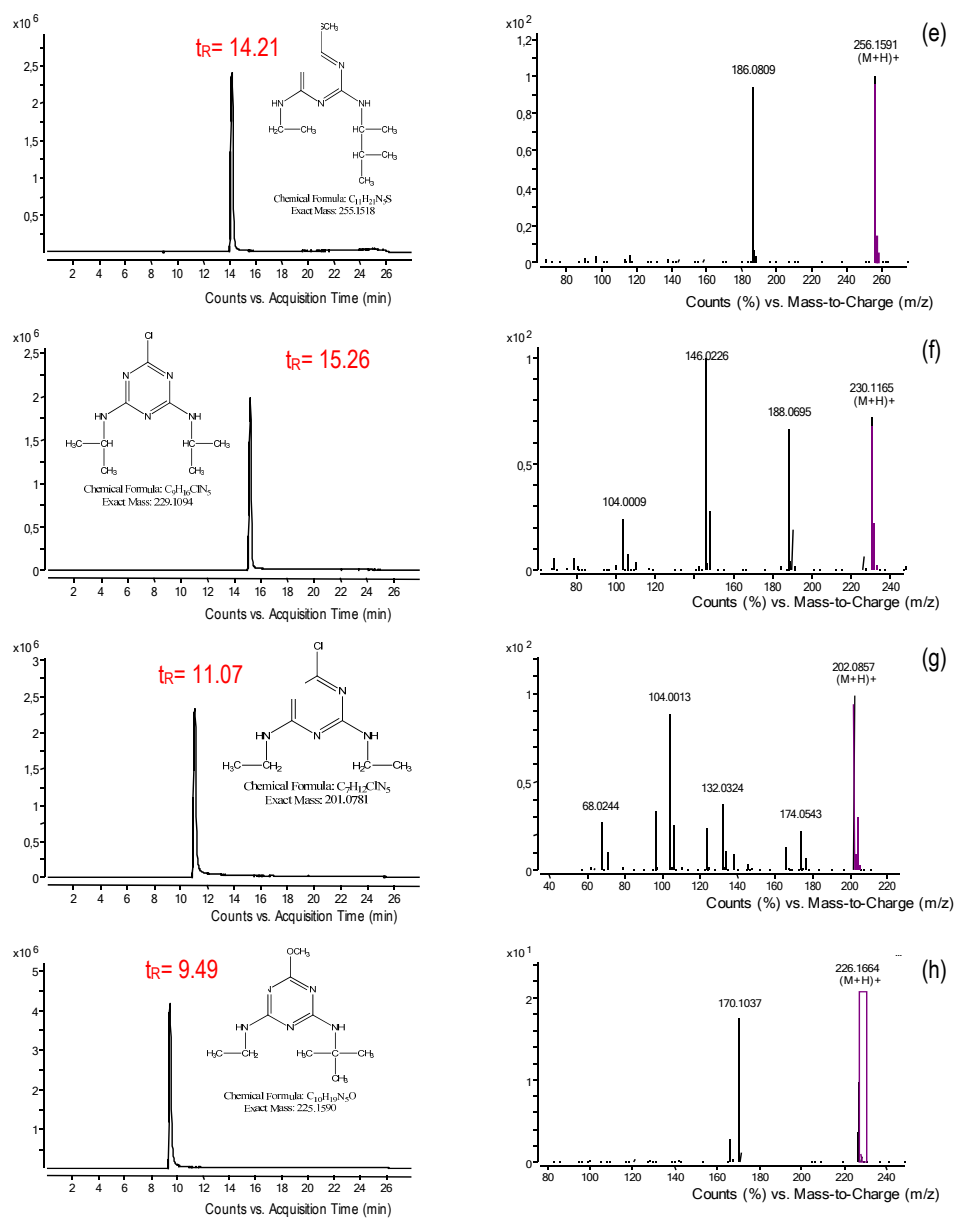


Figura 5.3.5. (continuación.) Cromatogramas de iones extraídos ($[M+H]^+$) (izquierda) y espectro de masas (derecha) de las triazinas estudiadas: (e) dimethametryn, (f) propazine, (g) simazine, (h) terbumeton.

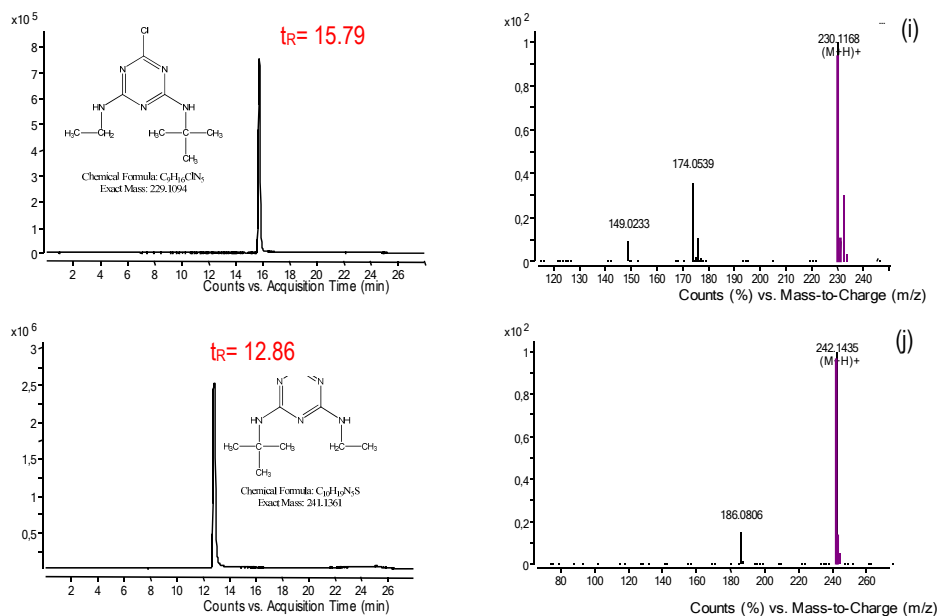


Figura 5.3.5. (continuación.) Cromatogramas de iones extraídos ($[M+H]^+$)(izquierda) y espectro de masas (derecha) de las triazinas en estudio: (i) terbutylazine (j) terbutryn.

5.3.3.2. Estudio de degradación de triazinas en disoluciones acuosas

Los ensayos de la degradación se desarrollaron en el reactor descrito, sometiendo a las disoluciones de las triazinas a radiación ultravioleta durante 60 minutos, y tomando muestras a distintos intervalos de tiempo para cada experimento. La Tabla 5.3.3. incluye los valores obtenidos en porcentajes de degradación de los plaguicidas estudiados. Todos muestran degradación frente a la exposición ultravioleta, a excepción del terbumeton, que muestra sólo una degradación del 46.40% a los 60 minutos de exposición de la luz ultravioleta.

Tabla 5.3.3. Degradación en porcentaje de las triazinas estudiadas, según el tiempo de exposición ultravioleta (minutos), en disoluciones acuosas.

Triazinas	Tiempo de exposición ultravioleta (minutos)									
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60
Ametryn	0.00	72.74	97.29	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Atrazine	0.00	72.21	98.69	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Cyanazine	0.00	67.65	94.94	97.75	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Desmetryn	0.00	69.87	95.28	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Dimethametryn	0.00	72.76	95.10	98.58	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Propazine	0.00	72.81	97.60	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Simazine	0.00	89.78	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Terbutylazine	0.00	57.73	78.79	91.86	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Terbutryn	0.00	52.64	96.62	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Terbumeton	0.00	8.97	11.37	16.26	16.94	24.29	29.48	32.40	42.82	46.40

En la Figura 5.3.6., se muestran la degradación de las triazinas, que se produce de forma completa trascurridos 20 minutos de exposición a la radiación UV, con la excepción del terbumeton, que presenta resistencia a ser degradado.

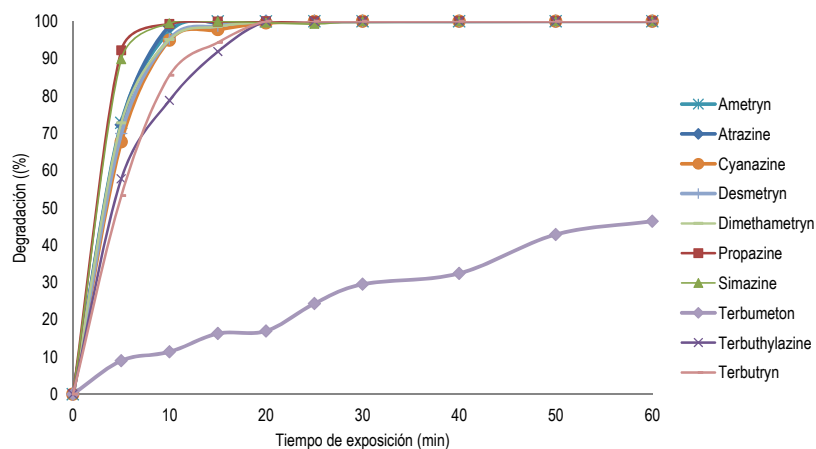


Figura 5.3.6. Curva de degradación de los plaguicidas, dónde se representa el tiempo de exposición frente al % de degradación en disoluciones acuosas.

5.3.3.3. Comportamiento cinético de las triazinas en disoluciones acuosas

El comportamiento cinético de la degradación de las triazinas en función del tiempo de exposición a la radiación ultravioleta se muestra en la Figura 5.3.7. Se observa que las triazinas se degradan rápidamente antes de los 10-15 minutos, a excepción del terbumeton, que sufrió una degradación lenta a lo largo de la exposición a la radiación.

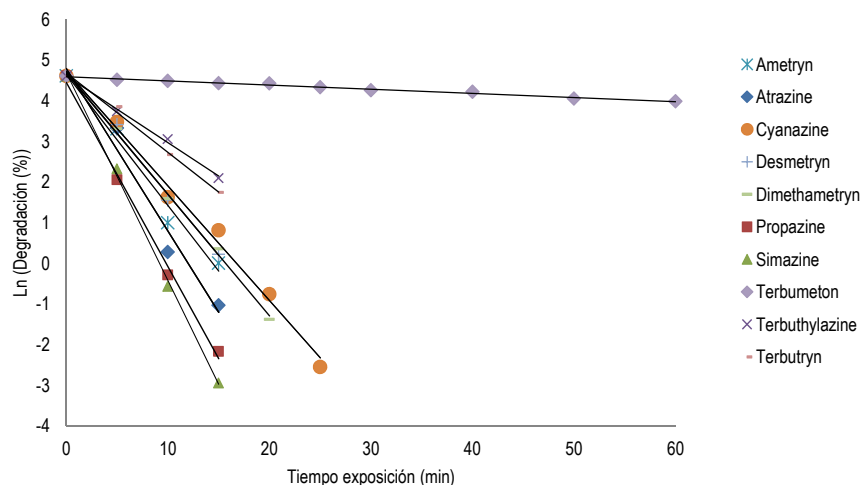


Figura 5.3.7. Demostración del comportamiento cinético de primer orden de las triazinas.

Las triazinas han mostrado un comportamiento cinético de primer orden tal y como se dedujo de la correlación lineal observada entre el logaritmo neperiano del porcentaje de compuesto degradado y el tiempo de exposición a la luz ultravioleta (Figura 5.3.7). Las constantes de velocidad aparentes de primer orden (K) y los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) estimados para cada triazina, junto con los coeficientes de regresión, se han incluido en la Tabla 5.3.4. De acuerdo con estos resultados, el orden de degradación de las triazinas bajo las condiciones experimentales de la luz ultravioleta utilizada es el siguiente: simazine > propazine > atrazine > ametryn > desmetryn ~ dimethametryn > cymazine > terbutryn > terbutylazine > terbumeton. El compuesto que presentó mayor resistencia a la luz ultravioleta fue el terbumeton. Estos datos son consistentes con los

que encontraron para la degradación de la atrazine sometida a la luz ultravioleta (254 nm) [272].

Tabla 5.3.4. Parámetros cinéticos de las triazinas en estudio.

	Triazinas	Rango evaluado (min)	Ecuación *	Coefficiente de regresión (R^2)	$K \times 10^3$ (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
1	Ametryn	0-15	$-0.3225x+4.6454$	0.9780	32.25	2.15
2	Atrazine	0-15	$-0.3994x+4.7876$	0.9600	39.94	1.74
3	Cyanazine	0-25	$-0.2819x+4.7232$	0.9915	28.19	2.46
4	Desmetryn	0-15	$-0.3003x+4.6971$	0.9935	30.03	2.31
5	Dimethametryn	0-20	$-0.2986x+4.6792$	0.9973	29.86	2.32
6	Propazine	0-15	$-0.4531x+4.4491$	0.9955	45.31	1.53
7	Simazine	0-15	$-0.5108x+4.6853$	0.9980	51.08	1.36
8	Terbutylazine	0-15	$-0.1643x+4.6073$	0.9965	16.43	4.22
9	Terbutryn	0-15	$-0.1954x+4.6812$	0.9940	19.54	3.55
10	Terbumeton	0-60	$-0.0103x+4.5886$	0.9838	1.03	67.28

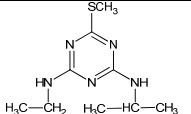
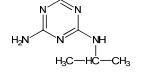
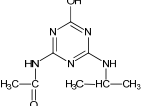
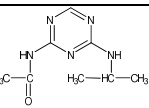
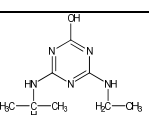
* $y = \ln(\text{Degradación } (\%))$, $x = \text{tiempo de exposición UV}$, K : Constante de velocidad, $t_{1/2}$: Tiempo de vida media

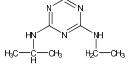
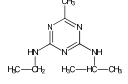
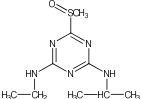
5.3.3.4. Identificación de PDs de las triazinas en soluciones acuosas

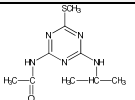
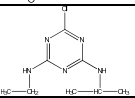
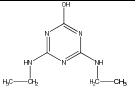
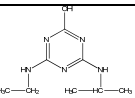
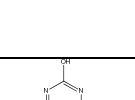
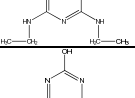
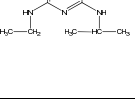
El análisis e identificación de los PDs, mediante LC-TOFMS se llevó a cabo siguiendo las etapas descritas en la sección 5.3.2.5. A fin de evaluar todos los productos de degradación disponibles, las muestras se tomaron con los intervalos siguientes (0, 5, 10, 15, 20, 40, 50 y 60 min) fueron recolectados para identificar mediante la técnica LC-TOFMS, todos los productos de degradación tal como se presenta en la Tabla 5.3.5, que también incluye los tiempos de retención, composición elemental más probable de los PDs, las masa/carga experimental y teórica, el error en ppm, el número equivalente de dobles enlaces (DBE), la referencias bibliográficas, en las que se encuentran descritos los compuestos, si las hay, las pérdidas o ganancias de masa y estructura propuesta. La determinación de la composición elemental más probable, según la masa/carga de los PDs, se ha realizado empleando la herramienta de cálculo de

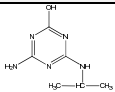
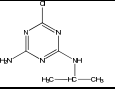
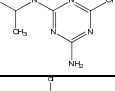
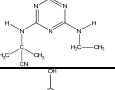
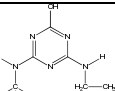
composiciones elementales del software. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.3.5., incluyendo los 10 compuestos estudiados y los 63 productos de degradación detectados.

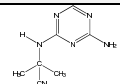
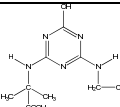
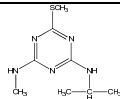
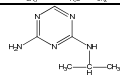
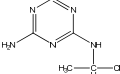
Tabla 5.3.5. Identificación de los principales PDs generados durante la exposición a radiación UV de las triazinas mediante LC-TOFMS.

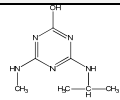
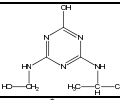
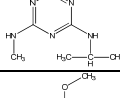
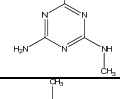
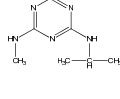
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
Ametryn	10.83	$C_9H_{17}N_5S$	228.1277	228.1277	1.02	4			
PD1	1.627	$C_6H_{11}N_5$	154.1081	154.1087	0.59	4		-SCH ₃ , -C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_3H_5N_5$	112.0618	112.0618	0.22	4			
PD2	1.929	$C_8H_{13}N_5O_2$	212.1144	212.1142	0.06	5		-SCH ₃ , -H ₂ , +O ₂	
Frag. 1		$C_6H_{11}N_5O$	170.1037	170.1036	0.41	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5O$	128.0577	128.0567	0.97	4			
PD3	2.969	$C_8H_{13}N_5O$	196.1191	196.1193	0.08	5		-SCH ₃ , -H ₂ , +O	
Frag. 1		$C_6H_{11}N_5$	154.1091	154.1087	1.35	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5$	112.0618	112.0618	0.22	4			
PD4	5.259	$C_8H_{15}N_5O$	198.1348	198.1350	0.53	4	[255]	-SCH ₃ , +O	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0877	156.0880	1.52	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5O$	128.0565	128.0567	1.84	4			

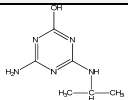
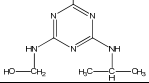
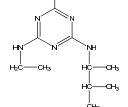
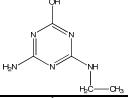
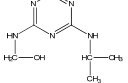
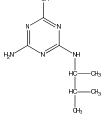
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD5	6.216	$C_8H_{15}N_5$	182.1400	182.1401	0.32	4		-SCH ₃	
Frag. 1		$C_5H_9N_5$	140.0929	140.0931	2.00	4			
PD6	7.379	$C_7H_{13}N_5S$	200.0964	200.0964	0.65	4	[255]	-C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_4H_7N_5S$	158.0495	158.0495	1.16	4			
PD7	7.842	$C_9H_{17}N_5$	196.1557	196.1558	0.68	4		-S	
Frag. 1		$C_6H_{11}N_5$	154.1090	154.1087	1.13	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5$	112.0620	112.0618	1.16	4			
PD8	9.758	$C_9H_{17}N_5OS$	244.1228	244.1227	0.56	4		+O	
Frag. 1		$C_{10}H_{16}N_2O_2S$	229.0993	229.0999	1.49	4			
Frag. 2		$C_9H_{15}N_5S$	226.1122	226.1121	0.48	5			
Frag. 3		$C_8H_{11}N_3O_4$	214.0796	214.0722	1.49	5			
Frag. 4		$C_8H_{15}N_5O$	198.1350	198.1349	0.09	4			
Frag. 5		$C_{10}H_{16}N_2O$	181.1332	181.1335	1.14	4			
Frag. 6		$C_6H_8N_4S$	169.0544	169.0542	0.92	5			
Frag. 7		$C_5H_9N_5O$	156.0879	156.0880	0.61	4			
Frag. 8		$C_5H_7N_5$	138.0785	138.0774	1.90	5			

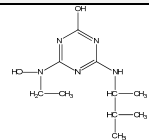
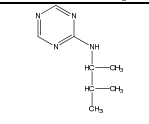
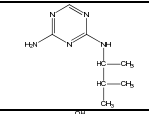
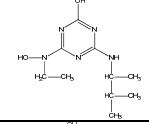
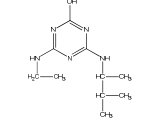
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD9	11.18	$C_9H_{15}N_5OS$	242.1071	242.1070	0.55	5		$-H_2, +O$	
Frag. 1		$C_7H_{13}N_5S$	200.0964	200.0964	0.44	4			
Atrazine	13.27	$C_8H_{14}ClN_5$	216.1010	216.1010	0.79	4			
PD1	1.355	$C_7H_{13}N_5O$	184.1199	184.1193	0.08	4	[255], [272]	$-Cl, +OH, -CH_2$	
Frag. 1		$C_6H_{10}N_4$	139.0980	138.0978	1.03	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5O$	128.0569	128.0537	1.89	4			
PD2	1.801	$C_8H_{15}N_5O$	198.1349	198.1350	0.44	4	[255]	$-Cl, +OH$	
Frag. 1		$C_6H_{11}N_5O$	170.1041	170.1036	1.59	4			
Frag. 2		$C_5H_9N_5O$	156.0880	156.0880	1.21	4			
Frag. 3		$C_3H_5N_5O$	128.0565	128.0567	1.58	4			
PD3	2.709	$C_7H_{13}N_5O$	184.1197	184.1195	1.09	4		$-Cl, +HO, -CH_2$	
Frag. 1		$C_4H_7N_3O$	114.0662	114.0662	0.20	3			
PD4	5.259	$C_8H_{15}N_5O$	198.1347	198.1349	0.28	4	[272]	$-Cl, +HO$	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0883	156.0881	1.71	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5O$	128.0566	128.0567	0.31	4			

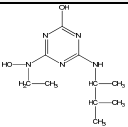
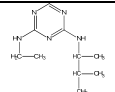
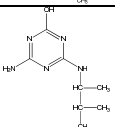
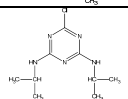
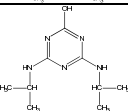
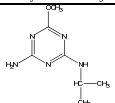
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD5	7.962	$C_6H_{11}N_5O$	170.1034	170.1036	1.98	4		-Cl, +HO, -C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_4H_7N_5O$	142.0727	142.0723	2.29	4			
Frag. 2		$C_5H_9N_3O$	128.0820	128.0818	0.94	3			
Frag. 3		$C_3H_5N_3O$	100.0508	100.0505	3.12	3			
PD6	9.684	$C_6H_{10}ClN_5$	188.0710	188.0712	0.29	4	[255], [272]	+C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_6H_{11}N_5O$	170.1037	170.1036	0.51	47			
Frag. 2		$C_3H_4ClN_5$	146.0232	146.0236	1.69	4			
PD7	14.17	$C_6H_{11}N_5O$	170.1036	170.1036	0.84	4		-Cl, +HO, -C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_3H_5N_3O$	100.0505	100.0505	0.12	3			
Frag. 2		$C_4H_5N_3$	96.0558	96.0556	2.24	4			
Cyanazine	11.68	$C_9H_{13}ClN_6$	241.0958	241.0863	2.03	6			
PD1	1.347	$C_9H_{16}N_6O_2$	241.1405	241.1408	1.09	5	[255]	-Cl, +H ₃ , +O ₂	
Frag. 1		$C_9H_{13}N_5O_2$	224.1144	224.1142	0.84	6			
Frag. 2		$C_5H_9N_5O$	156.0877	156.0881	2.01	4			
Frag. 3		$C_7H_{18}N_2O_6$	114.0661	114.0665	1.77	0			
PD2	1.597	$C_9H_{15}N_6O$	223.1306	223.1302	1.84	6	[255]	-Cl, +H ₂ O	

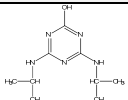
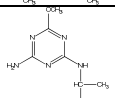
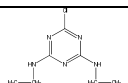
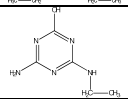
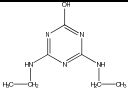
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD3	1.960	$C_7H_{10}N_6$	179.1040	179.1041	0.13	6		-Cl, +H, -C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_6H_9N_5$	152.0931	152.0931	0.01	5			
Frag. 2		$C_3H_5N_5$	112.0621	112.0620	1.65	4			
PD4	2.239	$C_9H_{15}N_5O_3$	242.1254	242.1254	1.79	5	[255]	-Cl, +H ₂ , +O ₃ , -N	
Frag. 1		$C_8H_{13}N_5O$	196.1195	196.1193	1.01	5			
Frag. 2		$C_6H_9N_3O_3$	172.0715	172.0717	1.04	4			
Desmetryn	9.038	$C_8H_{15}N_5S$	214.1120	214.1121	0.48	4			
PD1	1.364	$C_6H_{11}N_5O$	170.1036	170.1037	0.50	4	[255]	-SCH ₃ , +O, -CH	
Frag. 1		$C_3H_5N_5O$	128.0568	128.0567	0.59	4			
PD2	1.627	$C_6H_{11}N_5$	154.1085	154.1090	1.52	4		-SCH ₃ , -CH ₂	
Frag. 1		$C_3H_3N_3$	112.0618	112.0618	0.1	4			
PD3	1.892	$C_6H_{11}N_5$	154.1087	154.1087	0.24	4		-SCH ₃ , -CH ₂	
Frag. 1		$C_4H_5N_5$	124.0615	124.0616	1.41	5			
Frag. 2		$C_3H_5N_5$	112.0618	112.0618	0.01	4			

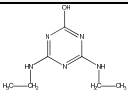
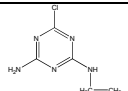
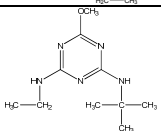
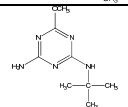
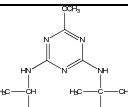
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD4	2.553	$C_7H_{13}N_5O$	184.1193	184.1193	0.17	4	[255]	-SCH ₃ , +O	
Frag. 1		$C_4H_7N_5O_2$	158.0673	158.0673	0.60	4			
Frag. 2		$C_4H_7N_5O$	142.0725	142.0723	1.05	4			
Frag. 3		$C_3H_6N_3O$	100.0507	100.0505	1.35	4			
Frag. 4		$C_3H_2N_2O$	83.0243	83.0240	1.56	4			
PD5	2.619	$C_7H_{13}N_5O_2$	200.1143	200.1142	0.40	4		-SCH ₃ , +O ₂	
Frag. 1		$C_4H_7N_5O_2$	158.0674	158.0675	0.76	4			
PD6	5.259	$C_8H_{15}N_5O$	198.1348	198.1349	0.05	4	[255]	-SCH ₃	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0880	156.0880	0.91	4			
PD7	5.311	$C_5H_9N_5O$	156.0884	156.0883	1.91	4		-SCH ₃ , -H, +O, -C ₃ H ₆ , CH ₃	
Frag. 1		$C_4H_7N_3O$	114.0659	114.0660	1.74	3			
PD8	6.216	$C_8H_{15}N_5$	182.1400	182.1400	0.24	4		-S	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0879	156.0880	0.30	4			
Frag. 2		$C_5H_9N_5$	140.0930	140.0931	0.22	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5$	112.0621	112.0620	1.42	4			

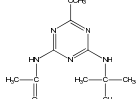
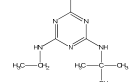
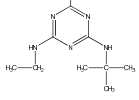
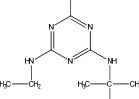
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD9	6.930	$C_6H_{11}N_5O$	170.1038	170.1036	0.74	4		$-SCH_3, +O, -CH_2$	
Frag. 1		$C_3H_5N_5$	112.0628	112.0627	1.25	4			
PD10	8.139	$C_8H_{15}N_5OS$	230.1068	230.1075	1.96	4	[255]	+O	
Dimethametryn	14.21	$C_{11}H_{21}N_5S$	256.1591	256.1590	0.3	4			
PD1	1.382	$C_5H_9N_5O$	156.0880	156.0880	0.09	4		$-SCH_3, +O, -C_5H_{10}$	
Frag. 1		$C_5H_9N_5$	140.0930	140.0930	0.41	4			
PD2	2.713	$C_7H_{13}N_5O$	184.1194	184.1193	0.63	4		$-SCH_3, +O, -C_3H_6$	
PD3	3.358	$C_8H_{15}N_5O$	198.1351	198.1349	0.18	4	[255]	$-SCH_3, +O, -C_2H_4$	
Frag. 1		$C_3H_5N_5O$	128.0567	128.0567	0.18	4			

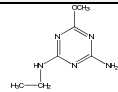
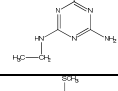
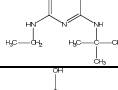
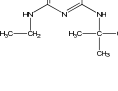
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD4	3.622	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂	242.1612	242.1612	0.23	4	[255]	-SCH ₃ , +O ₂	
PD5	4.042	C ₈ H ₁₄ N ₄	167.1293	167.1291	1.07	4		-SCH ₃ , -H, -C ₃ H ₆	
Frag. 1		C ₇ H ₁₀ N ₂	123.0918	123.0917	0.70	4			
Frag. 2		C ₅ H ₈ N ₂	97.0761	97.0760	0.45	3			
PD6	5.439	C ₈ H ₁₅ N ₅	182.1403	182.1400	1.66	4		-SCH ₃ , -C ₂ H ₄	
Frag. 1		C ₃ H ₅ N ₅	112.0620	112.0618	1.79	4			
PD7	7.890	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂	242.1617	242.1615	1.21	4	[255]	-SCH ₃ , +O ₂	
Frag. 1		C ₉ H ₁₇ N ₅	196.1561	196.1560	1.25	4			
Frag. 2		C ₅ H ₉ N ₅ O ₂	172.0828	172.0829	0.51	4			
PD8	8.122	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	226.1662	226.1662	0.05	4	[255]	-SCH ₃ , +O	
Frag. 1		C ₅ H ₉ N ₅ O ₂	172.0832	172.0829	1.71	4			
Frag. 2		C ₅ H ₉ N ₅ O	156.0880	156.0880	0.27	4			
Frag. 3		C ₄ H ₇ N ₃ O	114.0661	114.0662	0.65	3			

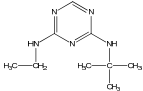
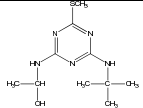
Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD9	8.164	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂	242.1617	242.1615	1.21	4	[255]	-SCH ₃ , +O ₂	
Frag. 1		C ₅ H ₉ N ₅ O ₂	172.0828	172.0829	0.44	4			
Frag. 2		C ₅ H ₉ N ₅ O	156.0883	156.0880	1.91	4			
PD10	9.023	C ₁₀ H ₁₉ N ₅	210.1715	210.1713	0.63	4		-SCH ₃	
Frag. 1		C ₅ H ₉ N ₅	140.0935	140.0934	1.10	4			
PD11	11.01	C ₈ H ₁₅ N ₅ O	198.1352	198.1349	1.11	4	[255]	-SCH ₃ , +O, -C ₂ H ₄	
Frag. 1		C ₉ H ₁₈ O ₈	128.0568	128.0569	1.28	1			
Propazine	15.26	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.1165	230.1167	0.79	4			
PD1	6.815	C ₉ H ₁₇ N ₅ O	212.1503	212.1506	1.29	4	[137]	-Cl, +H ₂ O, +CH ₂ -CH ₃	
Frag. 1		C ₆ H ₁₁ N ₅ O	170.1039	170.1036	1.62	4	[137]		
PD2	9.38	C ₇ H ₁₃ N ₅ O	184.1194	184.1193	0.49	4		-Cl, +HO	
Frag. 1		C ₄ H ₇ N ₅ O	142.0725	142.0723	1.04	4			

Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD3	13.03	$C_9H_{17}N_5O$	212.1503	212.1506	1.29	4	[137]	-Cl, +H ₂ O, CH ₂ -CH ₃	
PD4	15.51	$C_7H_{13}N_5O$	184.1196	184.1193	1.67	4		-Cl, +HO	
Frag. 1		$C_7H_{10}N_4O$	167.0930	167.0927	1.44	5			
Frag. 2		$C_4H_7N_5O$	142.0725	142.0723	1.04	4			
Frag. 3		$C_5H_{12}N_5O$	117.1023	117.1025	0.26	1			
Frag. 4		$C_3H_5N_3O$	100.0508	100.0507	1.48	3			
Frag. 5		$C_4H_3ClO_4$	75.9933	75.9933	0.53	3			
Simazine	11.07	$C_7H_{12}ClN_5$	202.0854	202.0854	0.22	4			
PD1	1.021	$C_5H_9N_5O$	156.0881	156.0880	0.31	4	[255]	-Cl, +H ₂ O, -CH ₂ -CH ₃	
PD2	1.384	$C_7H_{13}N_5O$	184.1192	184.1193	0.50	4		-Cl, +HO	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0879	156.0880	0.15	7			
Frag. 2		$C_5H_9N_5$	140.0930	140.0931	0.39	4			

Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD3	2.709	$C_7H_{13}N_5O$	184.1199	184.1194	0.36	4		-Cl, +HO	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0879	156.0880	0.26	4			
Frag. 2		$C_4H_7N_3O$	114.0662	114.0662	0.20	3			
PD4	7.581	$C_5H_8ClN_5$	174.0539	174.0541	1.23	4	[255]	-C ₂ H ₄	
Terbumeton	9.489	$C_{10}H_{19}N_5O$	226.1665	226.1662	1.30	4			
PD1	6.994	$C_8H_{15}N_5O$	198.1349	198.1349	0.24	4	[273],[281]	-C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_4H_7N_5O$	142.0722	142.0723	1.20	4	[282]		
Frag. 2		$C_3H_5N_3O$	100.0508	100.0507	1.26	3			
PD2	8.312	$C_{10}H_{19}N_5O_2$	242.1607	242.1612	1.86	4		+O	
Frag. 1		$C_9H_{21}NO_5$	224.1499	224.1497	1.94	0			
Frag. 2		$C_8H_{15}N_5O$	198.1348	198.1349	0.44	4			
Frag. 3		$C_6H_9N_5O$	168.0878	168.0880	1.37	5			

Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD3	10.05	$C_{10}H_{17}N_5O_2$	240.1457	240.1455	0.72	5	[273]	$-H_2, +O$	
Frag. 1		$C_8H_{15}N_5O$	198.1348	198.1349	0.44	4			
Frag. 2		$C_6H_9N_5O_2$	184.0828	184.0829	0.58	4			
Terbutylazine	15.79	$C_9H_{16}ClN_5$	230.1168	230.1167	0.56	4			
PD1	2.148	$C_3H_5N_5O$	128.0566	128.0567	0.69	4	[283]	$-Cl, H_2O, -C_5H_{10}, -CH_3$	
PD2	3.360	$C_3H_5N_5O$	128.0566	128.0567	0.69	4	[283]	$-Cl, +H_2O, -C_5H_{10}, -CH_3$	
PD3	3.486	$C_9H_{17}N_5O$	212.1504	212.1506	0.86	4	[255]	$-Cl, +HO$	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0879	156.088	0.76	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5O$	128.0566	128.0567	0.69	4			
PD4	7.161	$C_9H_{17}N_5O$	212.1507	212.1506	0.74	4		$-Cl, +H, +O$	
Frag. 1		$C_5H_{10}N_5O$	156.0882	156.0880	1.40	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5O$	128.0569	128.0567	1.87	4			
Frag. 3		$C_4H_7N_3O$	114.0666	114.0665	1.47	3			

Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD5	7.401	$C_6H_{11}N_5O$	170.1036	170.1036	0.07	4		-Cl, +CH ₃ +O, -C ₄ H ₈	
Frag. 1		$C_4H_7N_5O$	142.0724	142.0723	0.71	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_3O$	100.0508	100.0507	1.94	3			
PD6	9.169	$C_7H_{13}N_5O$	184.1190	184.1193	1.39	4		-Cl, +HO, -C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_3H_5N_5O$	128.0566	128.0567	0.58	4			
PD7	9.631	$C_6H_{11}N_5O$	170.1035	170.1036	0.53	4		-Cl, +CH ₃ +O, -C ₄ H ₈	
Frag. 1		$C_4H_7N_5O$	142.0725	142.0723	1.05	4			
Frag. 2		$C_5H_9N_3O$	128.0818	128.0818	0.19	3			
Terbutryn	12.86	$C_{10}H_{19}N_5S$	242.1436	242.1434	0.87	4			
PD 1	2.140	$C_7H_{13}N_5O$	184.1193	184.1195	1.14	4	[284]	-SCH ₃ +O, -C ₂ H ₄	
Frag. 1		$C_3H_5N_5O$	128.0569	128.0565	1.77	4			
PD2	7.161	$C_9H_{17}N_5O$	212.1506	212.1507	0.36	4	[255]	-SCH ₃ +O	
Frag. 1		$C_5H_9N_5O$	156.0880	156.0881	0.50	4			
Frag. 2		$C_3H_5N_5O$	128.0566	128.0567	0.48	4			

Triazinas y productos de degradación	t_R (min)	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE	Referencias Bibliográficas	Perdida o ganancia	Estructura propuesta
PD3	7.942	C ₉ H ₁₇ N ₅	196.1557	196.1560	1.44	4	[285]	-SCH ₃	
Frag. 1		C ₅ H ₉ N ₅	140.0933	140.0932	1.11	4			
Frag. 2		C ₃ H ₅ N ₅	112.0617	112.0617	0.85	4			
Frag. 3		C ₄ H ₇ N ₃	98.0711	98.0713	1.30	3			
PD4	11.54	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ OS	258.1383	258.1385	0.88	4	[255]	+O	
Frag. 1		C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂ S	243.1152	243.1151	1.94	4			
Frag. 2		C ₆ H ₁₁ N ₅ OS	202.0754	202.0757	1.42	4			
Frag. 3		C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	187.0522	187.0523	1.43	4			
Frag. 4		C ₆ H ₉ N ₅ S	184.0649	184.0651	1.15	5			
Frag. 5		C ₅ H ₉ N ₅ O	156.0879	156.0880	0.73	4			
Frag. 6		C ₅ H ₇ N ₅	138.0779	138.0778	1.67	5			
Frag. 7		C ₄ H ₇ N ₃ O	114.0663	114.0662	0.69	3			

Error: diferencia entre m/z experimental y m/z teórica (de la composición elemental asignada)

DBE: Número equivalente de dobles enlaces y ciclos

Los resultados de medidas de masas exactas de iones mostrados en la Tabla 5.3.5 permitieron obtener las composiciones elementales de los PDs. Sin embargo, para algunos casos, esta información no fue suficiente para conocer la estructura exacta, ya que algunos de ellos pueden haber varias posibilidades/isómeros. Por este motivo, se llevaron a cabo estudios adicionales mediante el uso de experimentos *pseudo* MS/MS de fragmentación en la región de transporte de los iones (in-source CID), con el fin de facilitar la identificación y estructura de los compuestos. En la Tabla 5.3.5., se han propuesto las estructuras de los diferentes PDs y a la vez se han detallado los PDs que previamente se han descrito en la bibliografía mediante UV u otras técnicas de degradación.

5.3.3.5. Formación y degradación de los productos de degradación de las triazinas en disoluciones acuosas

Se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de evaluar la influencia del tiempo de exposición ultravioleta en la degradación de las triazinas estudiadas así como la formación de los PDs. Para ello, se tomaron alícuotas de la disolución de triazinas estudiadas en agua Milli-Q durante diferentes periodos de tiempo (0 a 60 min), para su posterior análisis mediante LC-TOFMS. Los PDs detectados de las triazinas estudiadas no estaban presentes a t=0 minutos, mientras que entre los 5 y 10 minutos de exposición la presencia de estos PDs es mayoritaria, en la mayoría de los casos. También hay que considerar relevante que casi en todos los casos los PDs no fueron degradados en su totalidad, por lo que su potencial toxicidad debe ser investigada, ya que en algunos casos el producto de degradación puede ser más tóxico que el originario [110].

En la Figura 5.3.11., se muestra la formación y degradación de los PDs del ametryn, en la que se deduce que, tras 35 min de exposición, los productos PD6 y PD9 se han degradado casi por completo. Sin embargo, la degradación del PD8 es más lenta y, tras

ese tiempo de exposición, aún queda alrededor de un 25% sin degradar (con respecto a la cantidad de PD máxima formada). Por otra parte, se aprecia que los PD1, PD2, PD3, PD4, PD5 y PD7 no presentan degradación hasta los 60 minutos de exposición, siendo éstos de mayor abundancia y permanencia. Todos los PDs identificados del ametryn no habían sido descritos antes del presente estudio, con la excepción del ametryn PD6, PD8 y PD9.

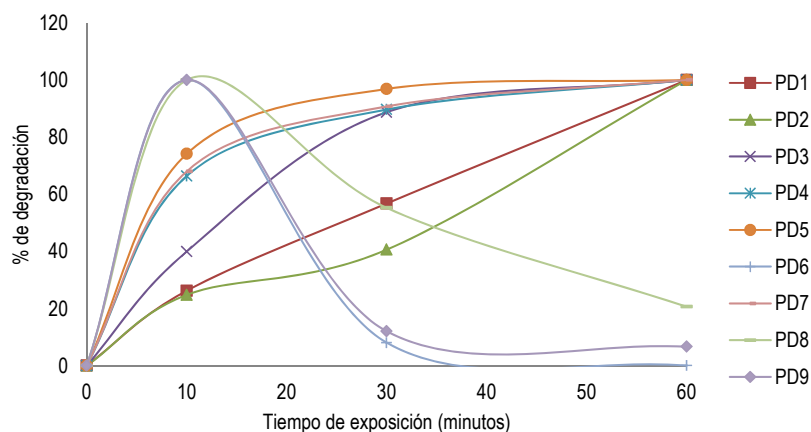


Figura 5.3.11. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en el ametryn en matrices acuosas.

En la Figura 5.3.12, se muestran los cromatogramas superpuestos obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición ultravioleta. Se puede observar con facilidad la formación de los PDs del ametryn. En el caso de PD6, PD8 y PD9, tanto su formación como su degradación son muy rápidas. Por el contrario, los productos PD1, PD2, PD3, PD4, PD5 y PD7, presentan un comportamiento diferente, de forma que a medida que aumenta el tiempo de exposición siguen en proceso de formación. Estos compuestos son resistentes a la radiación UV.

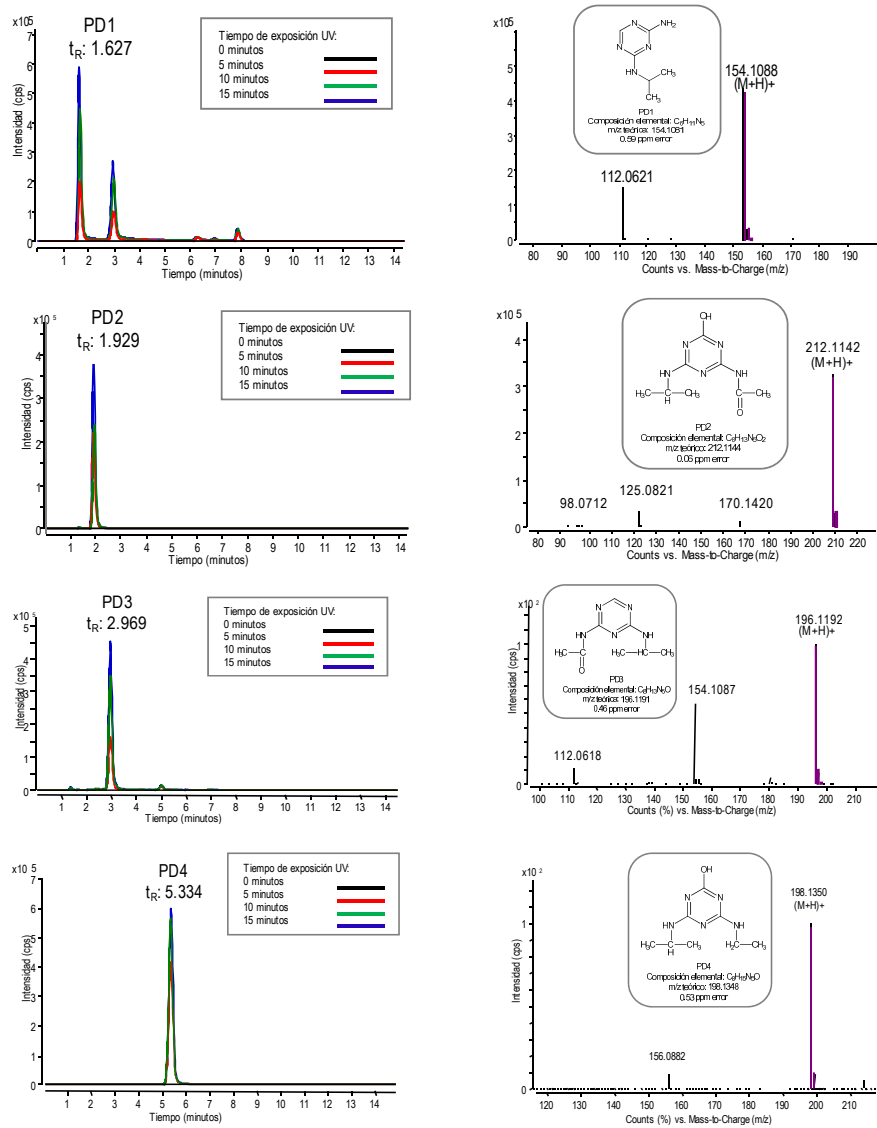


Figura 5.3.12. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, PD3 y PD4 del ametryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

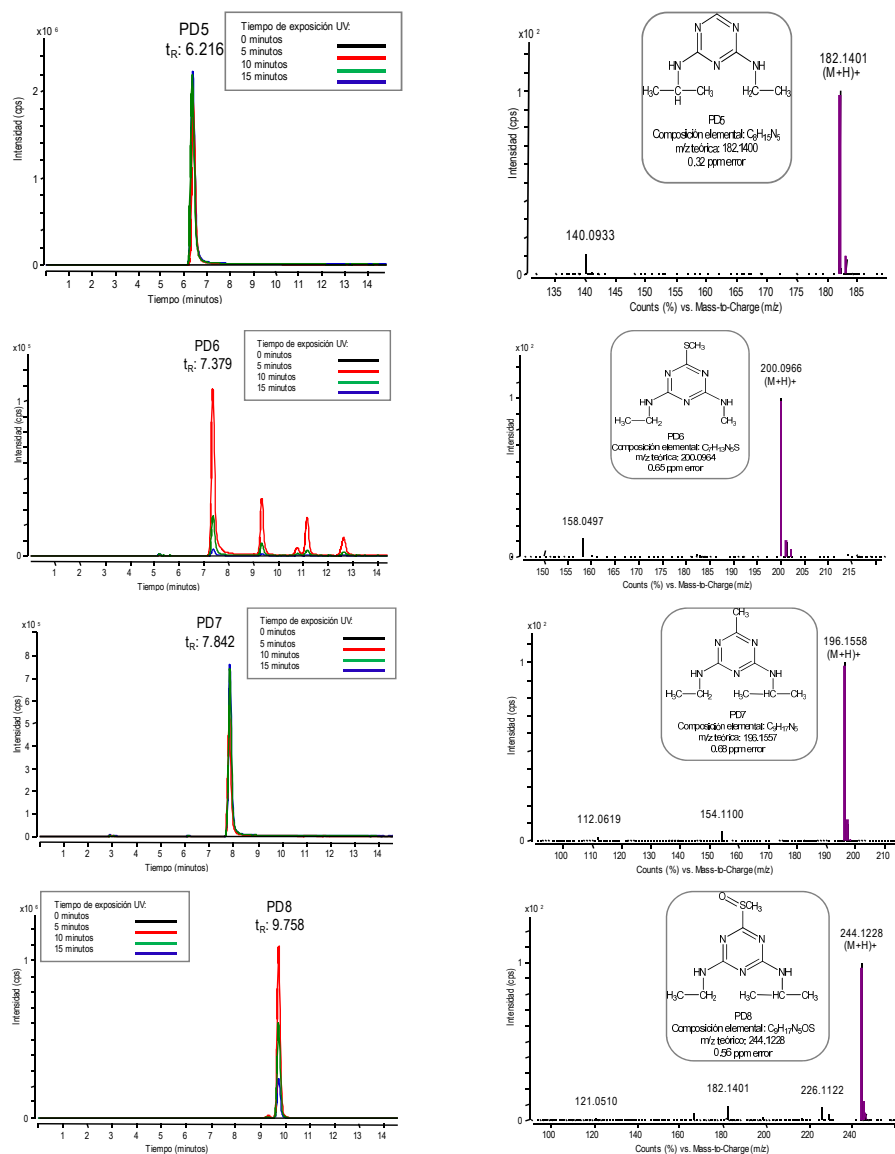


Figura 5.3.12. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD5, PD6, PD7 y PD8 del ametryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

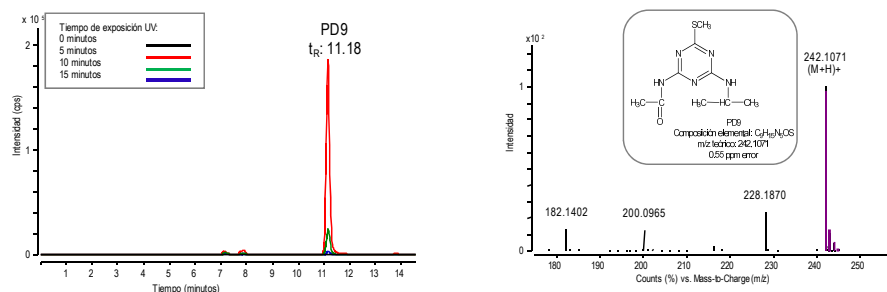


Figura 5.3.12. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de PD9 del ametryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

En la Figura 5.3.13. se muestran los resultados obtenidos para atrazine. Se puede observar que, tras 60 minutos de exposición, la mayoría de los PDs detectados están todavía en fase de formación salvo el PD6. Los principales productos de degradación de la atrazine, que se generan son: por sustitución del cloro, por hidroxilación (atrazine-2-hydroxy(PD2)), o por reacciones de desalquilación (en el caso de los PD1 y PD3), muy comunes en algunos herbicidas [255].

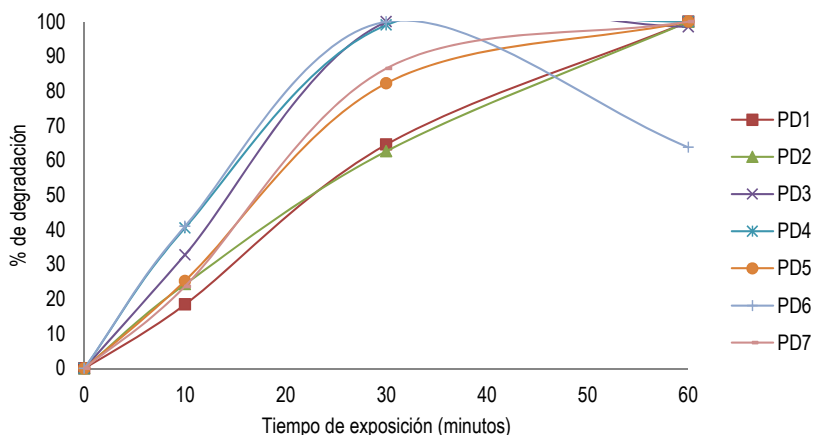


Figura 5.3.13. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en la atrazine en matrices acuosas.

En la Figura 5.3.14., se han superpuesto los cromatogramas del atrazine obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición ultravioleta, y se puede observar claramente la formación de los PDs.

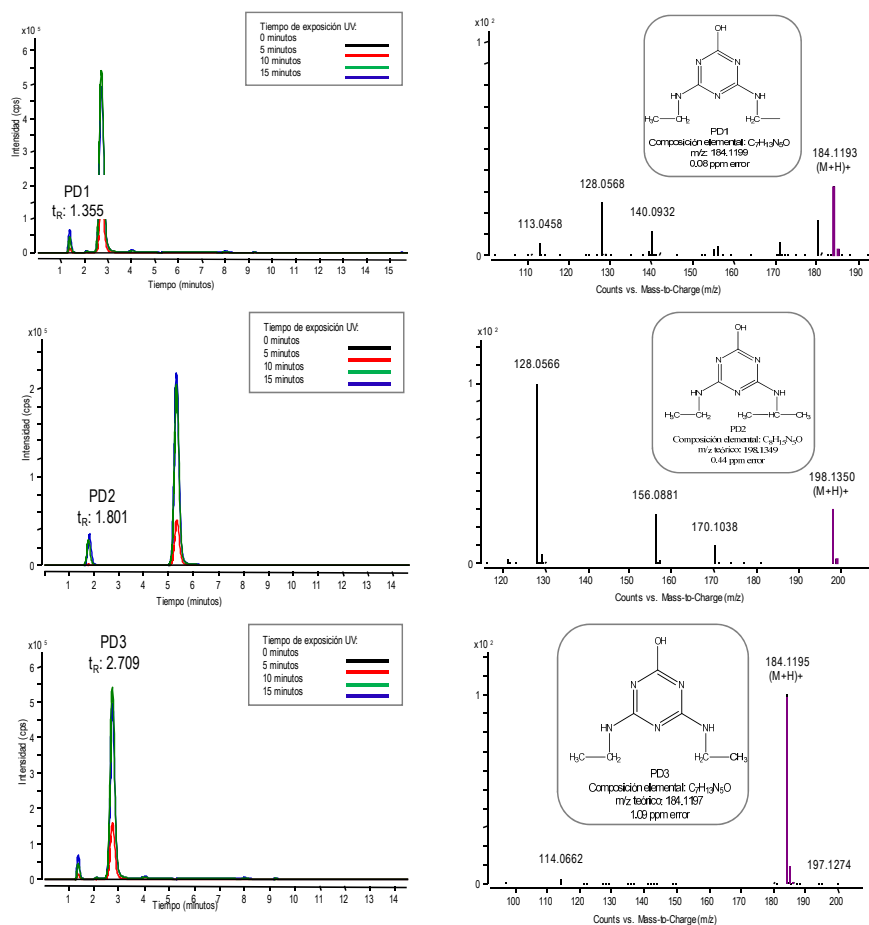


Figura 5.3.14. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, y PD3 de la atrazine con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

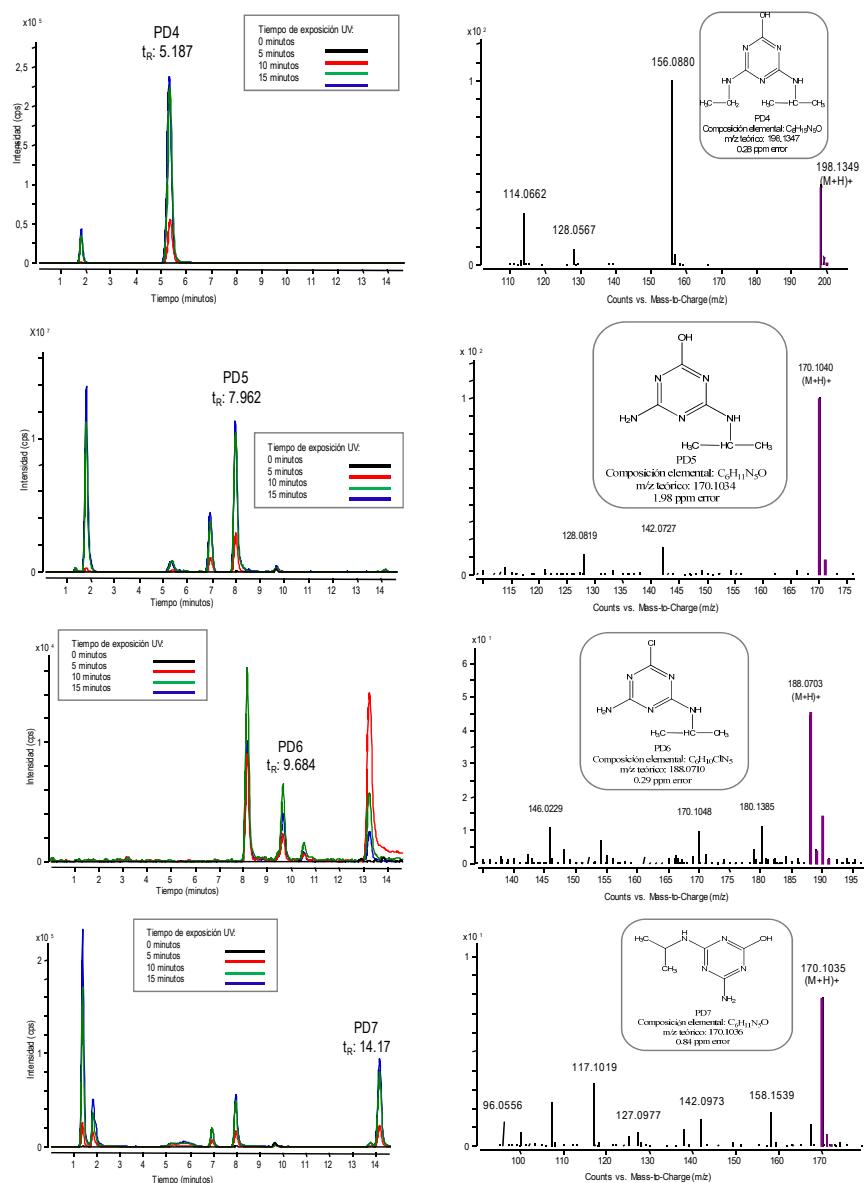


Figura 5.3.14. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD4, PD5, PD6 y PD7 de la atrazina con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

En la Figura 5.3.15., se observa que, tras 10 min de exposición a la luz ultravioleta, se forman los PDs y su permanencia. Casi todos los PDs tienden a tener permanencia a excepción del PD3 que se va degradando.

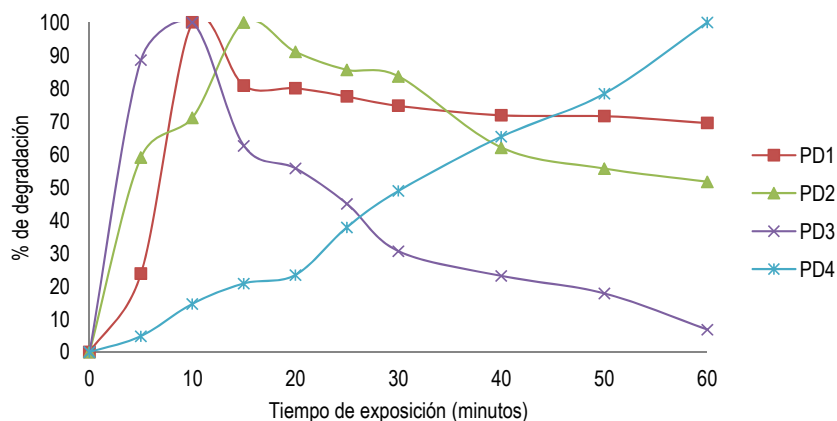


Figura 5.3.15. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en la cyanazine en matrices acuosas.

La Figura 5.3.16, muestra cromatogramas superpuestos del cyanazine obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición ultravioleta, se puede observar claramente la formación de los PDs, con 10 minutos de exposición la presencia de los PDs en área aumenta y es mayor, en todos los casos, conforme pasa el tiempo se van degradando, pero no llega a ser al 100% de degradación a los 60 minutos de exposición. Podemos observar los principales productos de degradación de la cyanazine, en la que los PD1, PD2 y PD4, son productos encontrados en diferentes investigaciones en la que se observa la sustitución del cloro, originando la fotooxidación en la cyanazine.

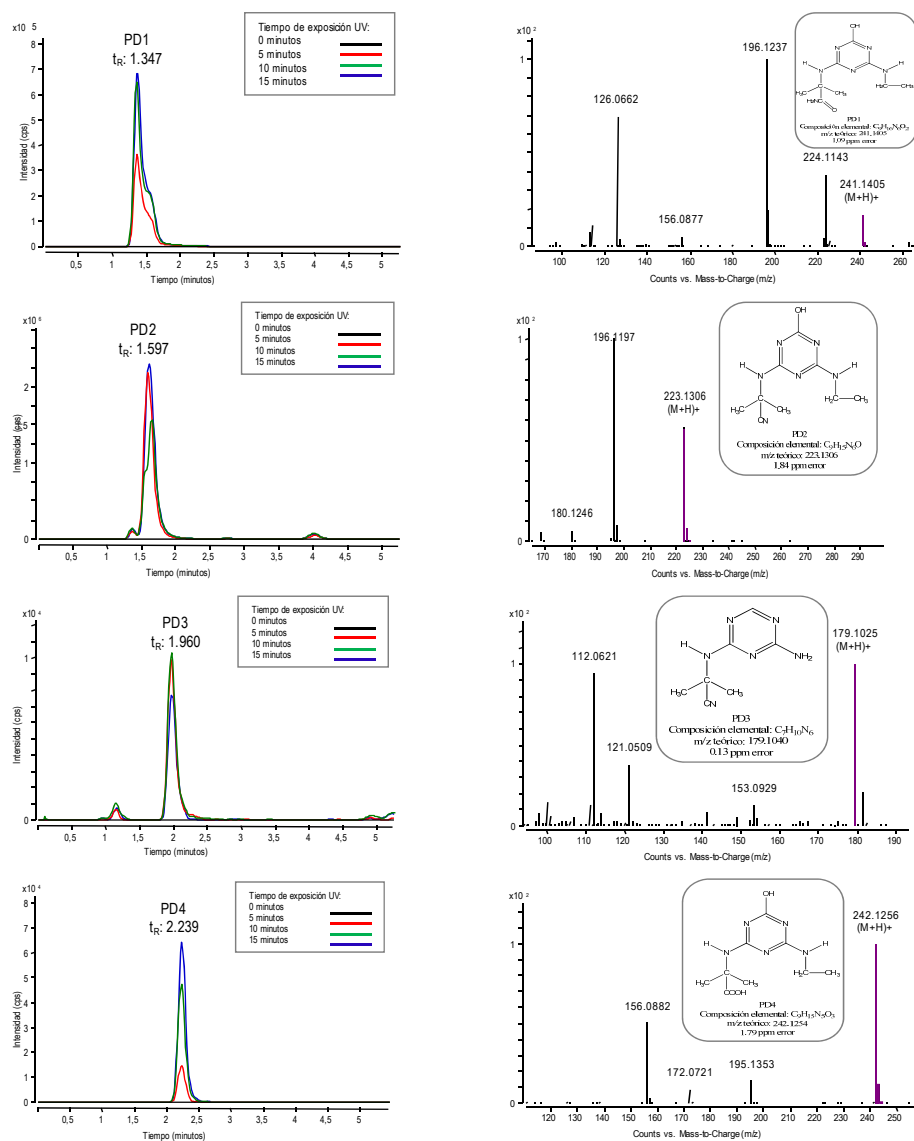


Figura 5.3.16. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, PD3 y PD4 del cyanazine con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error.

En la Figura 5.3.17., se muestran los resultados obtenidos para el desmetryn. Se puede observar la formación progresiva conforme avanza el experimento para la mayoría de los PDs del desmetryn. Ninguno de los PDs detectados se degradan antes de los 60 minutos de exposición ultravioleta.

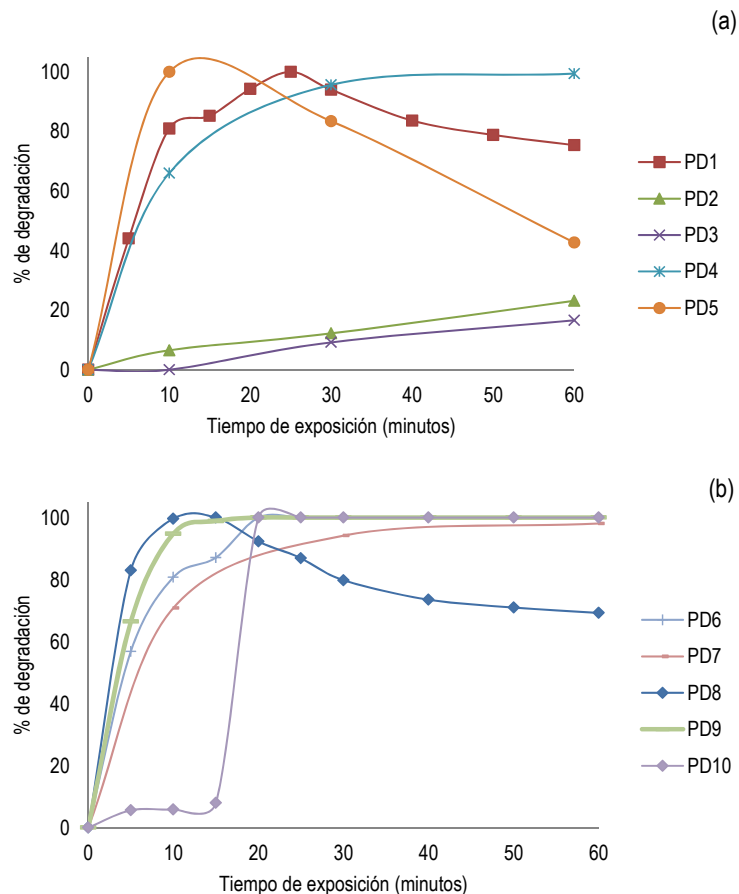


Figura 5.3.17. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en la desmetryn en matrices acuosas (a) PDs del PD1 al PD5 y (b) PDs del PD6 al PD10.

En la Figura 5.3.18, se han superpuesto los cromatogramas del desmetryn obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición ultravioleta.

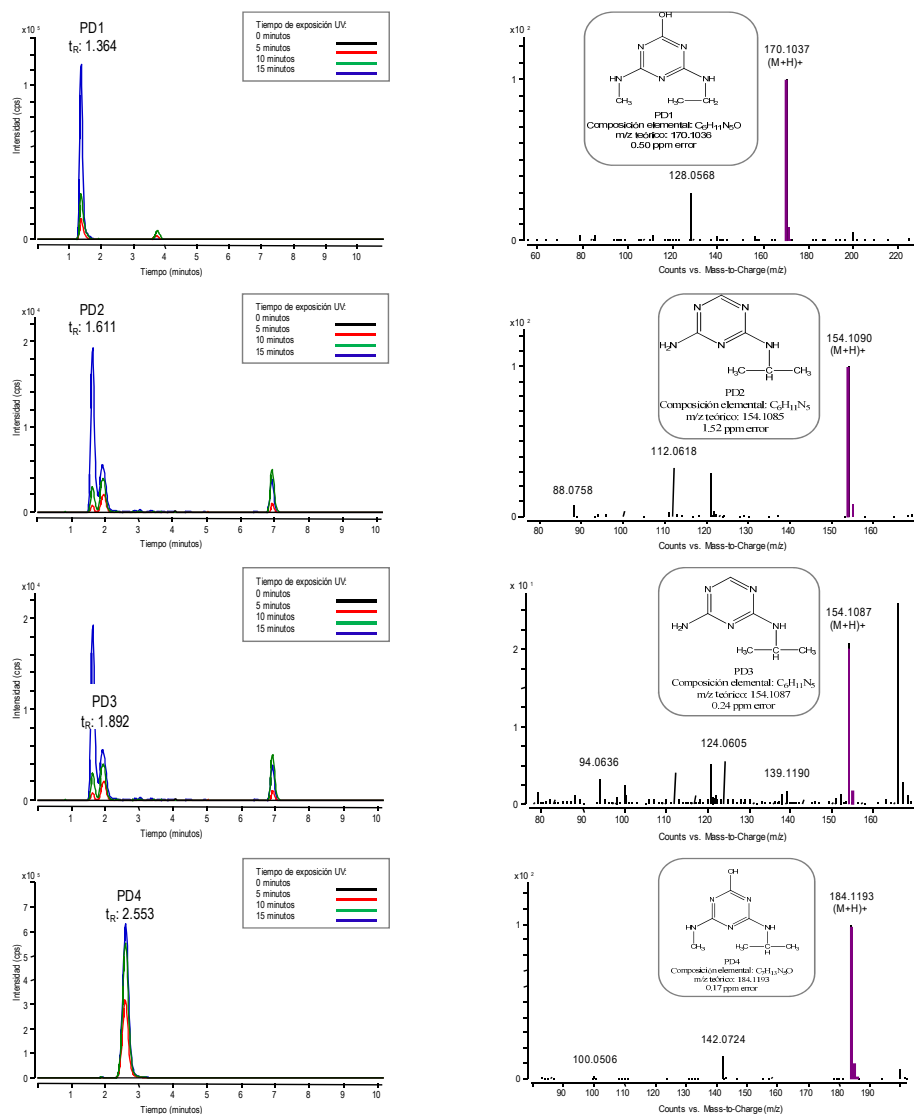


Figura 5.3.18. Superposición de los cromatogramas de iones extraído (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, PD3 y PD4 del desmetryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

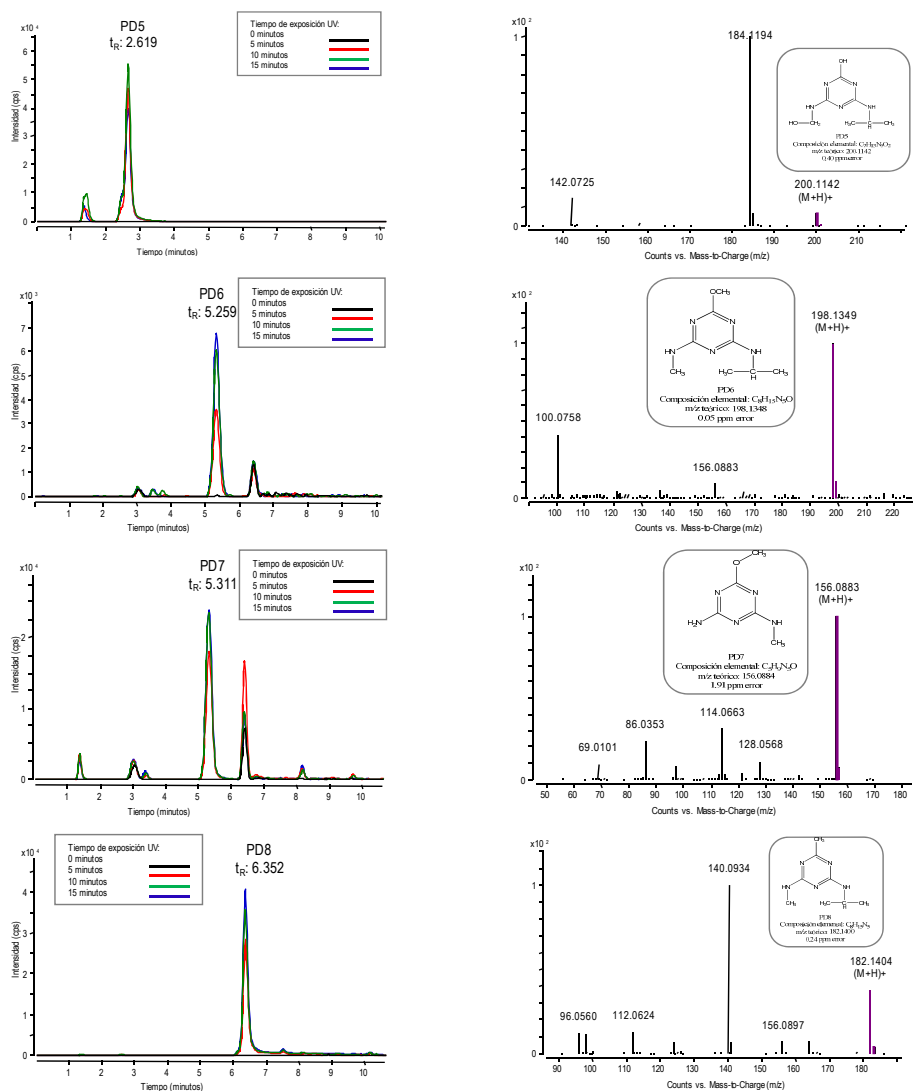


Figura 5.3.18. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD5, PD6, PD7 y PD8 del desmetryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

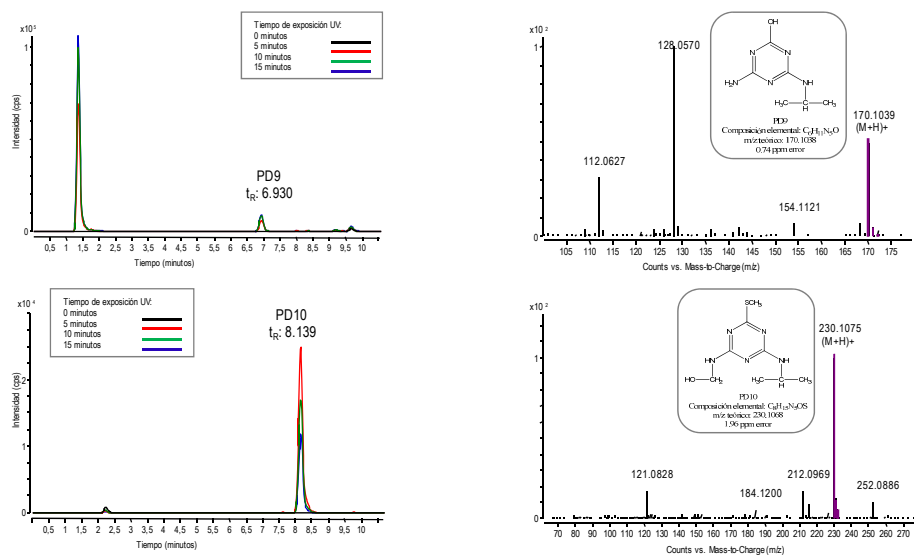


Figura 5.3.18. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD9 y PD10 del desmetryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

En la Figura 5.3.19. (a) y (b) se muestran los resultados obtenidos para el dimethametryn. Se puede observar la formación y degradación hasta 11 PDs del dimethametryn, que se forman en su mayoría a los 5 minutos de exposición. La presencia de estos PDs aumenta en casi todos los casos conforme pasa el tiempo. Sin embargo, salvo los productos PD9 y PD11, el resto no se degrada completamente antes de los 60 minutos.

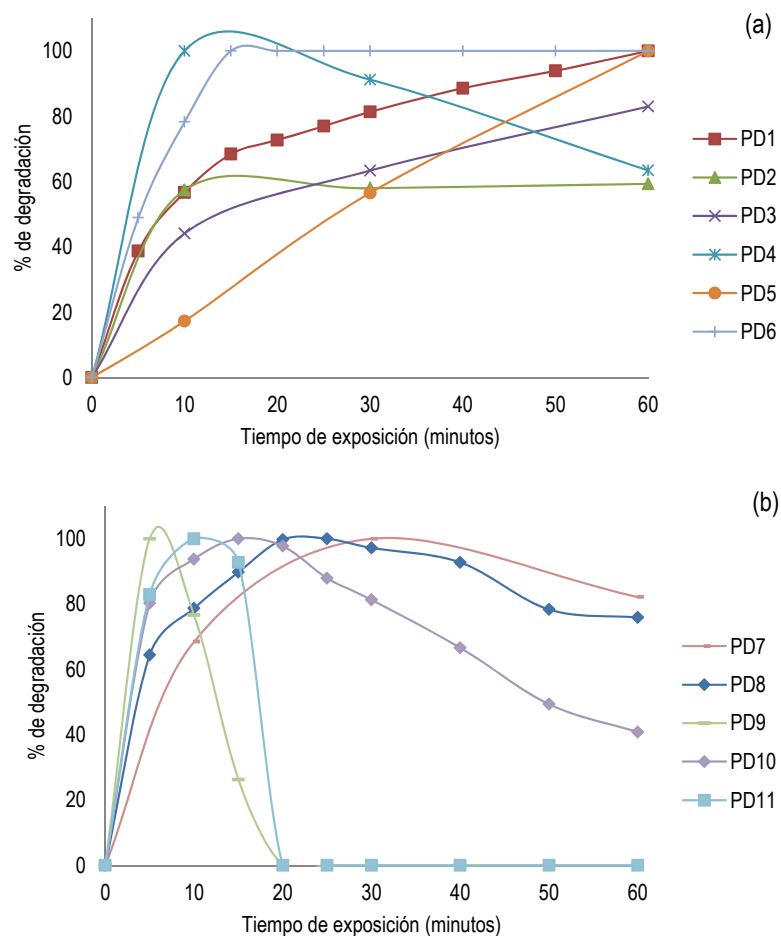


Figura 5.3.19. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en el dimethametryn en matrices acuosas, (a) PDs del PD1 al PD6 y (b) PDs del PD7 al PD11.

En la Figura 5.3.20, se han superpuesto los cromatogramas de los PDs del dimethametryn obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición ultravioleta, se puede observar claramente la formación de los PDs, a los 5 y 10 minutos de exposición.

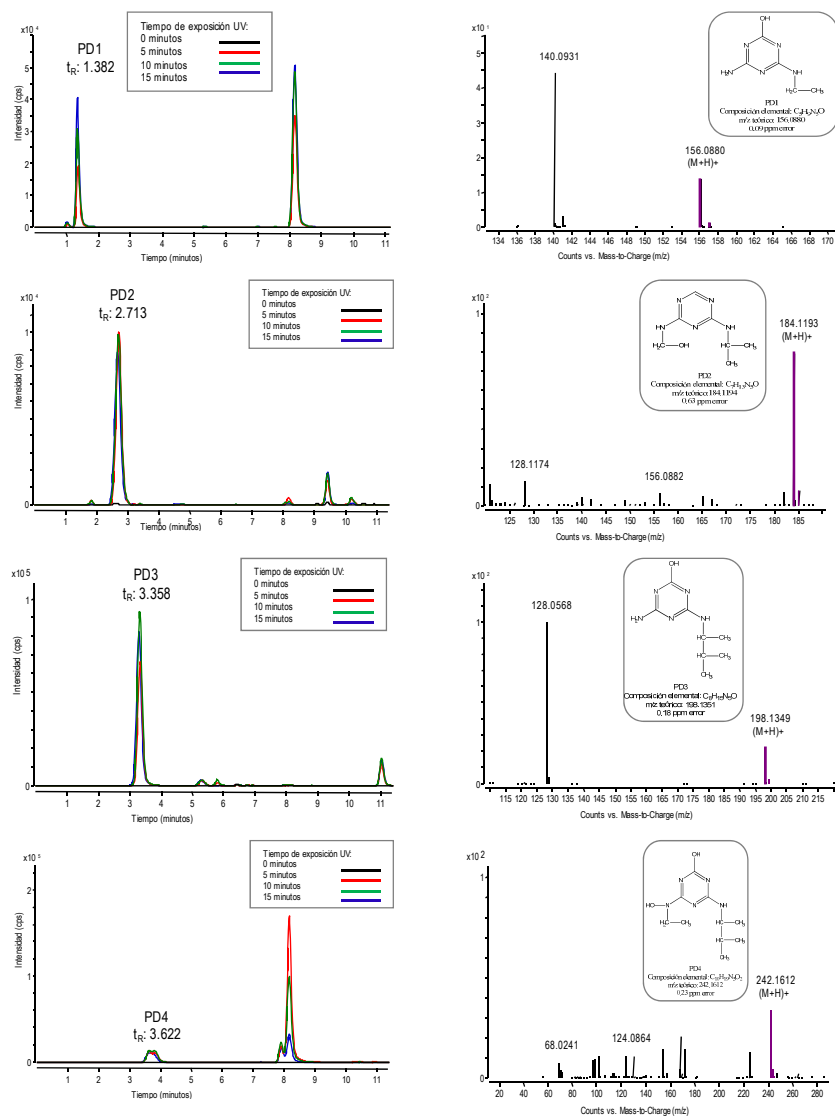


Figura 5.3.20. Superposición de los cromatogramas de iones extraído (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, PD3 y PD4 del dimethametryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

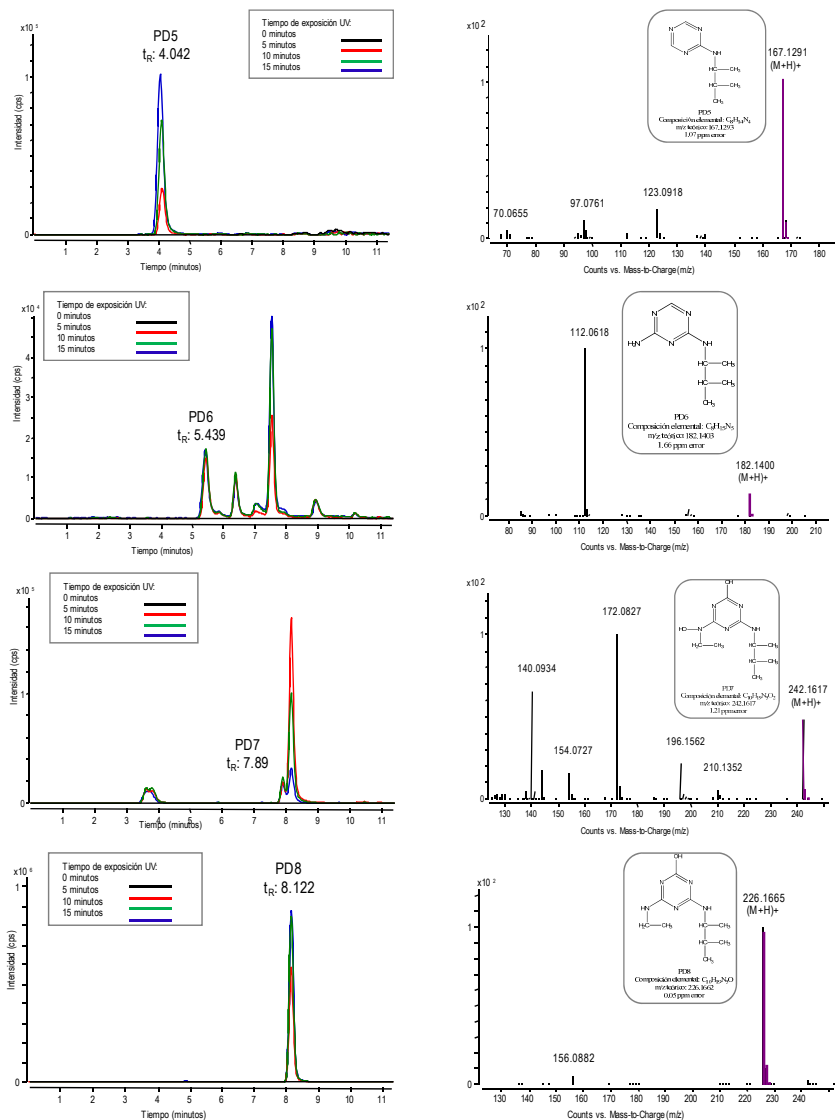


Figura 5.3.20. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraído (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD5, PD6, PD7 y PD8 del dimethametryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

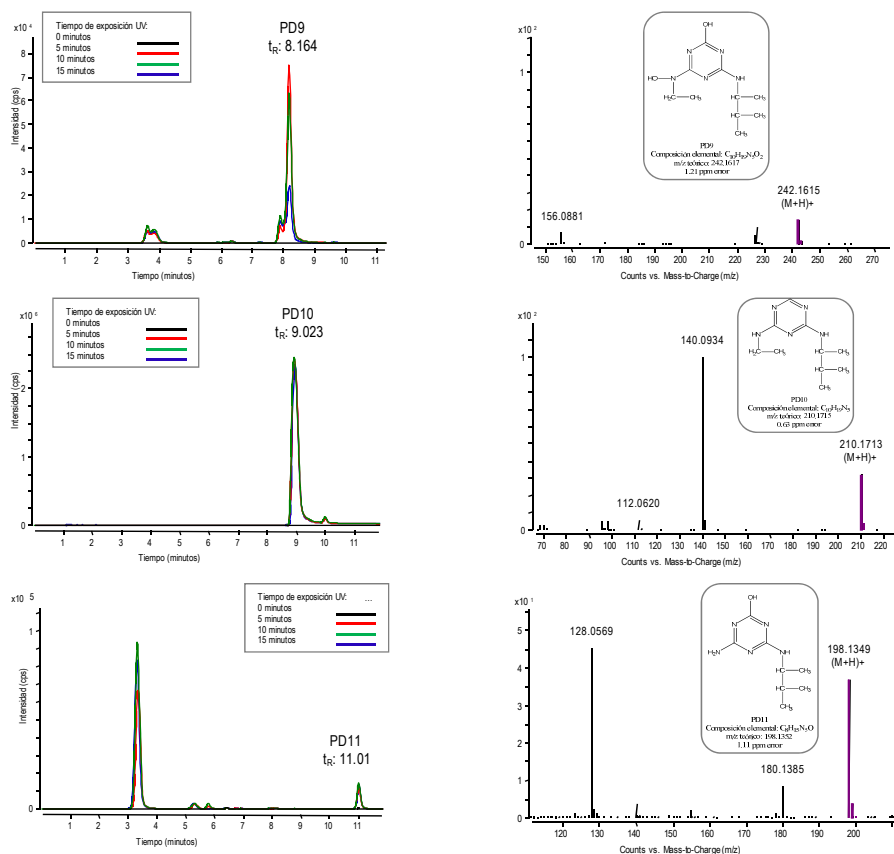


Figura 5.3.20. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraído (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD9, PD10 y PD11 del dimethametryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

Por lo que respecta al estudio de propazine, en la Figura 5.3.21., se muestra la formación de los 4 PDs detectados. El PD2 se desarrolla al 100% a los 10 minutos y luego se degrada a los 20 minutos, teniendo una permanencia corta. El resto de los compuestos identificados es mucho más resistente a la radiación. Sólo en el caso del PD1 se observa una cierta disipación al final del experimento.

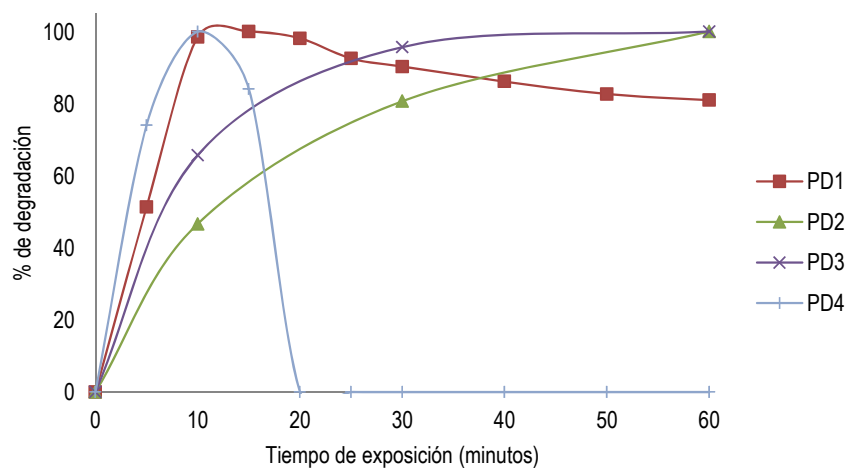


Figura 5.3.21. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en la propazine en matrices acuosas.

En la Figura 5.3.22, se han superpuesto los cromatogramas extraídos de los PDs de propazine obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición.

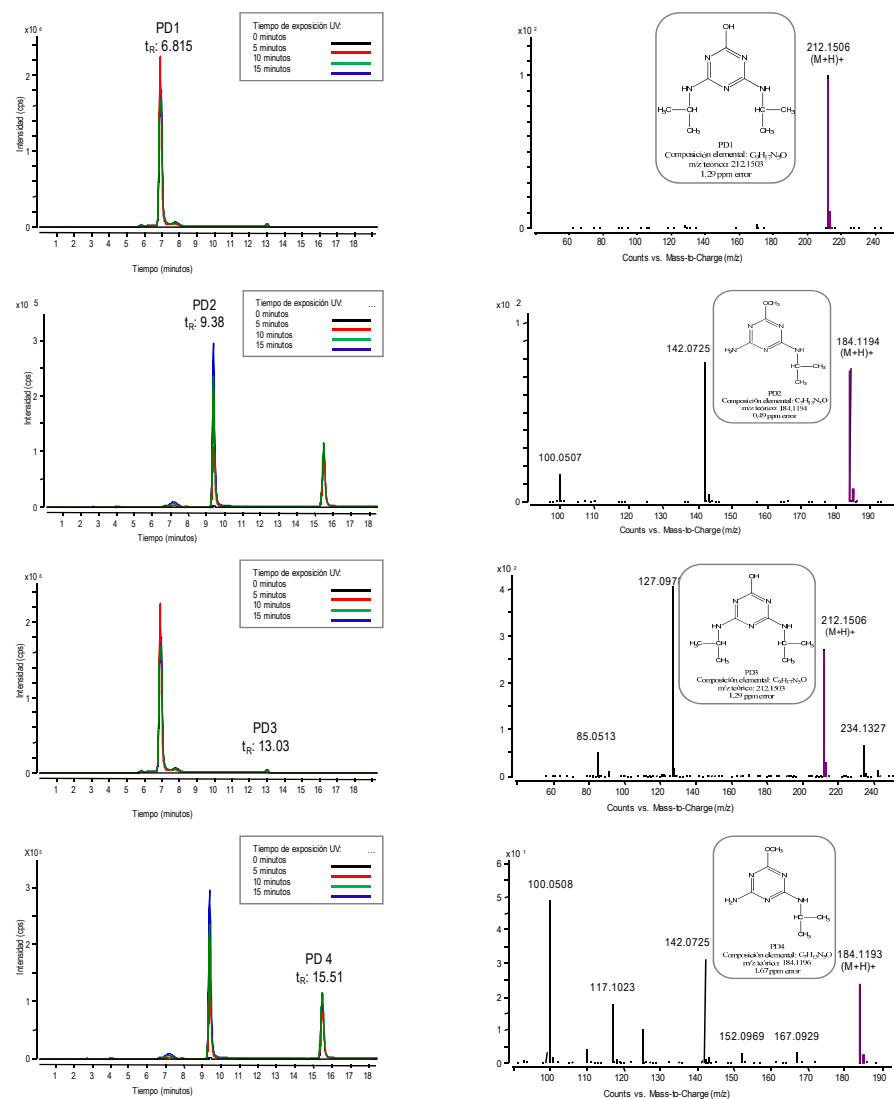


Figura 5.3.22. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, PD3 y PD4 de la propazine con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

Por lo que respecta al estudio de la simazine, en la Figura 5.3.23., podemos observar la formación de los 4 PDs detectados. El único que presenta una degradación rápida es el PD4. , Tanto el PD2 como el PD3 persisten al tratamiento ultravioleta hasta después de los 60 minutos. En el caso del PD1, registra su mayor abundancia a los 50 minutos aproximadamente, pero al final de la exposición a la ultravioleta, se puede observar la tendencia a degradarse aunque de forma muy ligera.

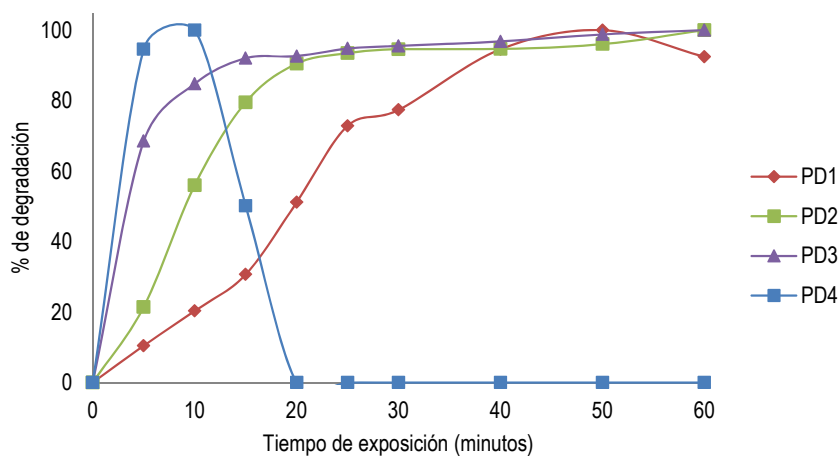


Figura 5.3.23. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en la simazine en matrices acuosas.

En la Figura 5.3.24, se han superpuesto los cromatogramas de los PDs de simazine obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición ultravioleta.

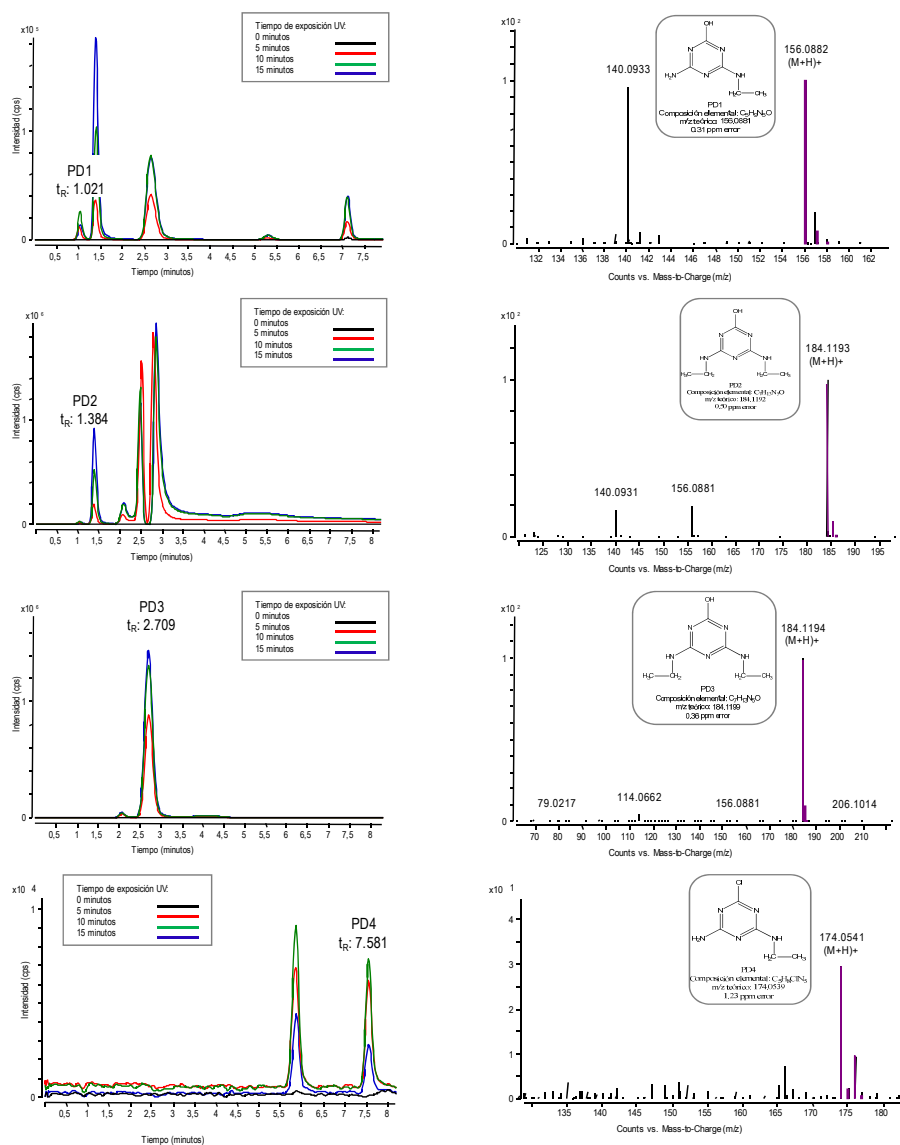


Figura 5.3.24. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, PD3 y PD4 de la simazine con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

En cuanto al estudio de degradación del terbumeton, en la Figura 5.3.25, se puede observar la formación y degradación de los 3 PDs detectados, que se forman a los 5-10 minutos de exposición. Todos los PDs presentan un comportamiento similar y muestran resistencia a ser degradados hasta después de los 60 minutos. En este caso, el producto de partida (terbumeton) tuvo un porcentaje de degradación muy bajo, lo que justifica que se sigan formando y aumentando la cantidad de los PDs ya que el proceso de degradación del terbumeton va más allá de los 60 minutos incluidos en el experimento.

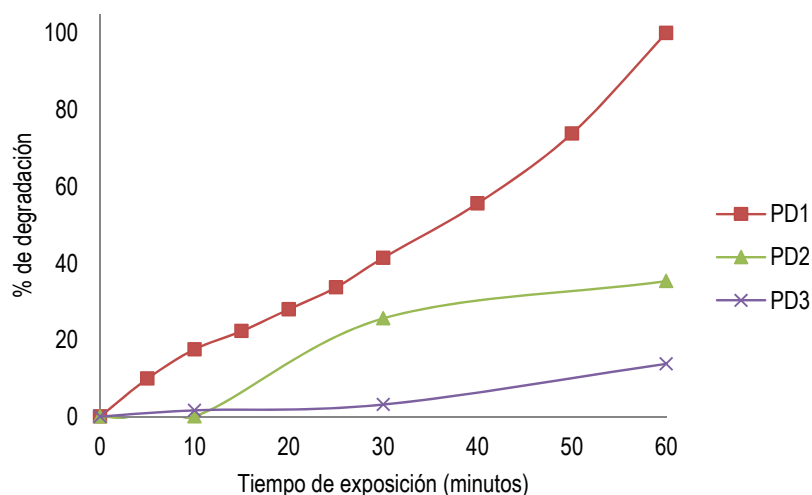


Figura 5.3.25. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en la terbumeton en matrices acuosas.

En la Figura 5.3.26, se han superpuesto los cromatogramas de los PDs de terbumeton obtenidos en los experimentos correspondientes de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición ultravioleta.

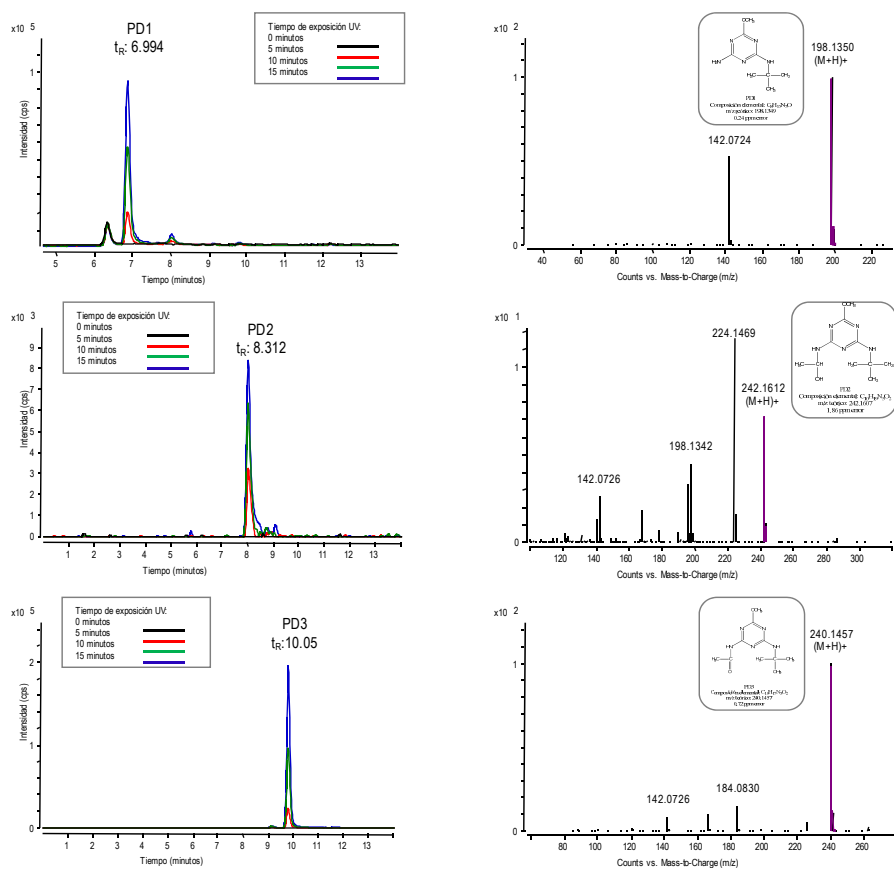


Figura 5.3.26. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2 y PD3 del terbutumeton con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

Por lo que respecta a la degradación de la terbutylazine, en la Figura 5.3.27., podemos observar la degradación de los 7 PDs detectados. A los 15 minutos de exposición la

presencia de casi todos los PDs es máxima. Por otra parte, los compuestos PD2, PD3 y PD6 resisten al tratamiento ultravioleta hasta después de los 60 minutos. En el caso de los demás PDs no son persistentes hasta el final del tiempo de exposición a la luz ultravioleta.

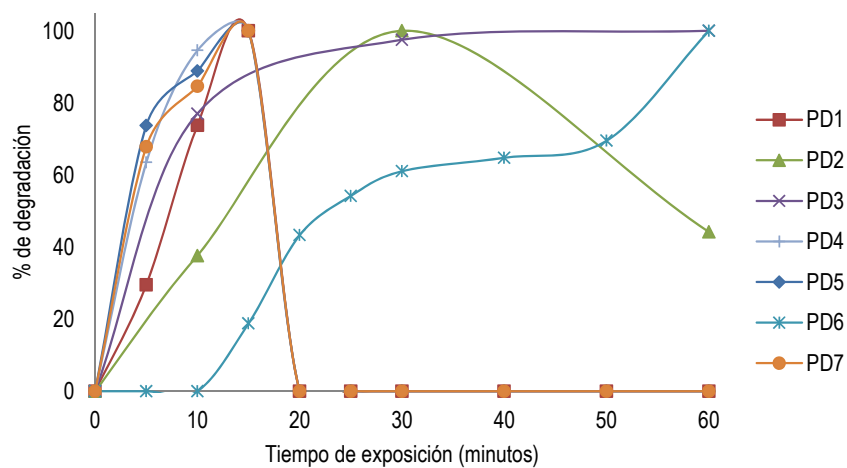


Figura 5.3.27. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta en la terbutylazine en matrices acuosas

En la Figura 5.3.28, se muestran los cromatogramas extraídos superpuestos de los PDs de terbutylazine obtenidos en los experimentos de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición.

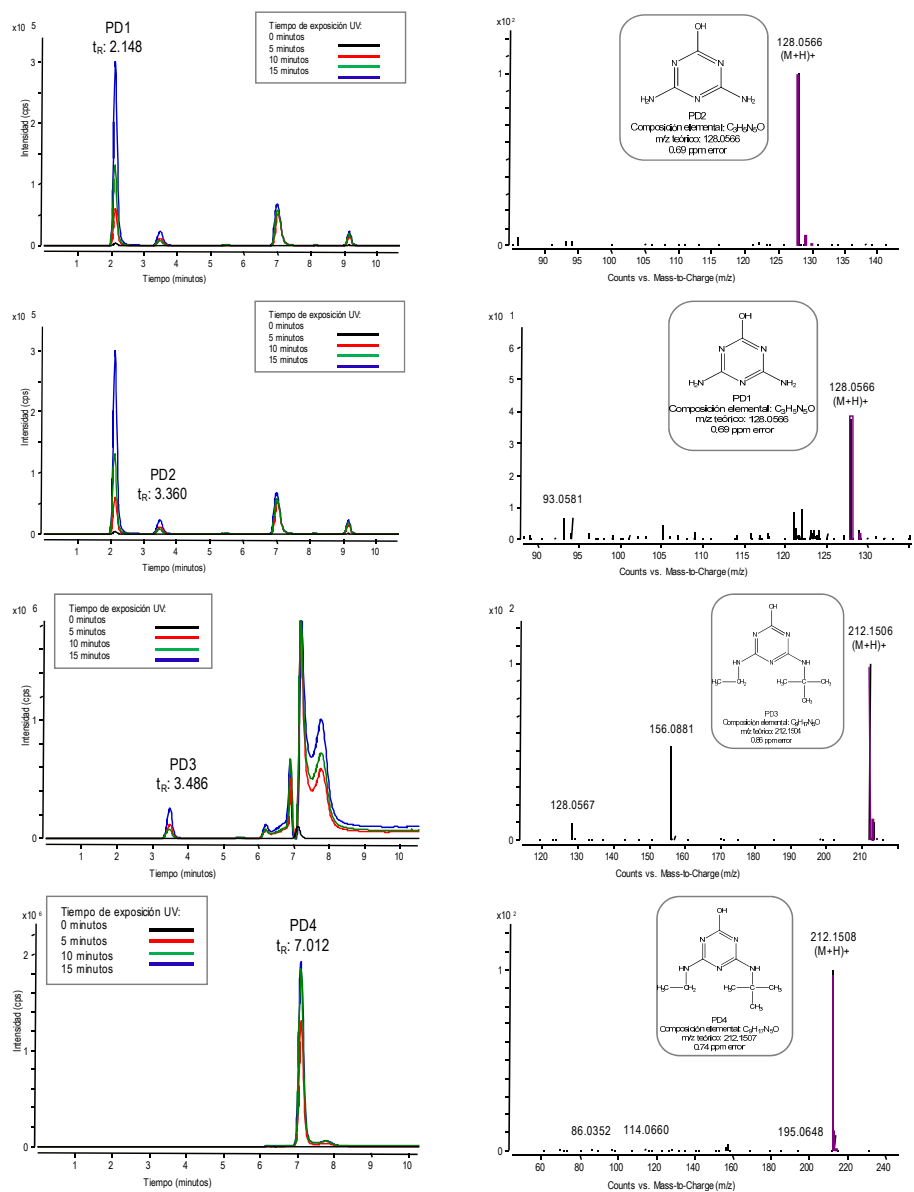


Figura 5.3.28. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD1, PD2, PD3 y PD4 del terbutylazine con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

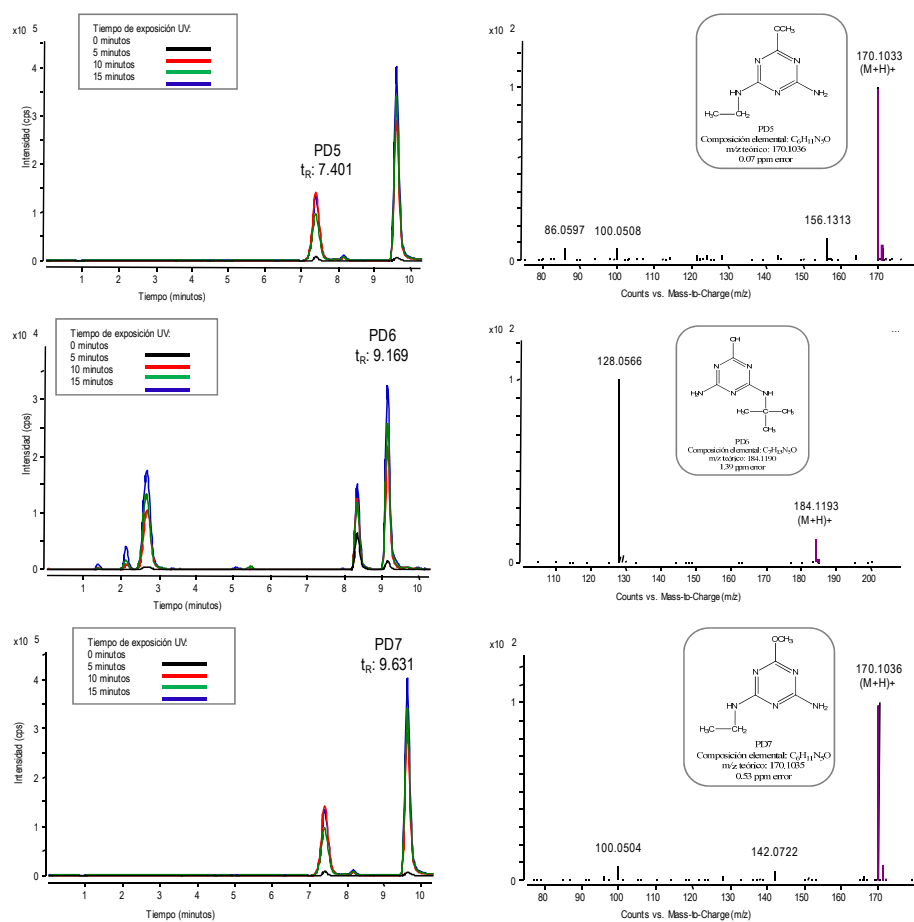


Figura 5.3.28. (Continuación) Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD5, PD6 y PD7 del terbutylazine con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

Por último, la Figura 5.3.29, muestra la formación y degradación de los 4 PDs detectados en el experimento con terbutryn. En este caso, la presencia de los productos de degradación es ya notoria a los 5 minutos de exposición, observándose que el único PD que se degrada al 100% es el PD4, mientras que los otros PDs se mantienen después de los 60 minutos.

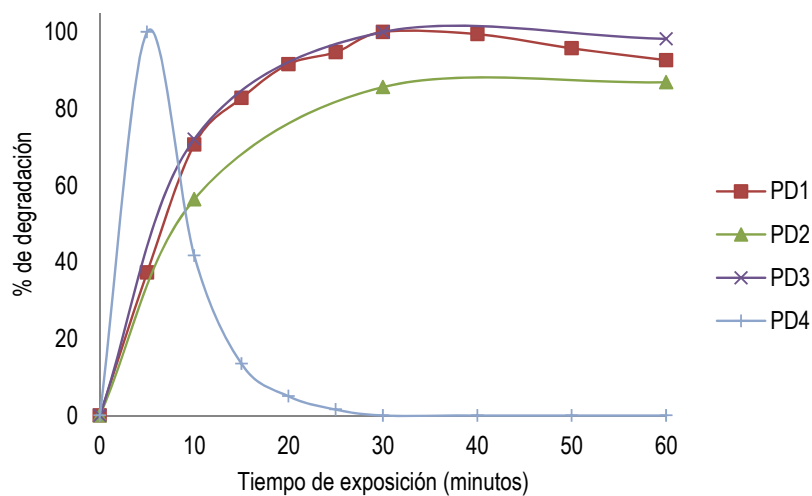


Figura 5.3.29. Formación y degradación de los PDs generados por la exposición ultravioleta de terbutryn en matrices acuosas.

En la Figura 5.3.30, se muestran los cromatogramas extraídos superpuestos de los PDs de terbutryn obtenidos en los experimentos de 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición.

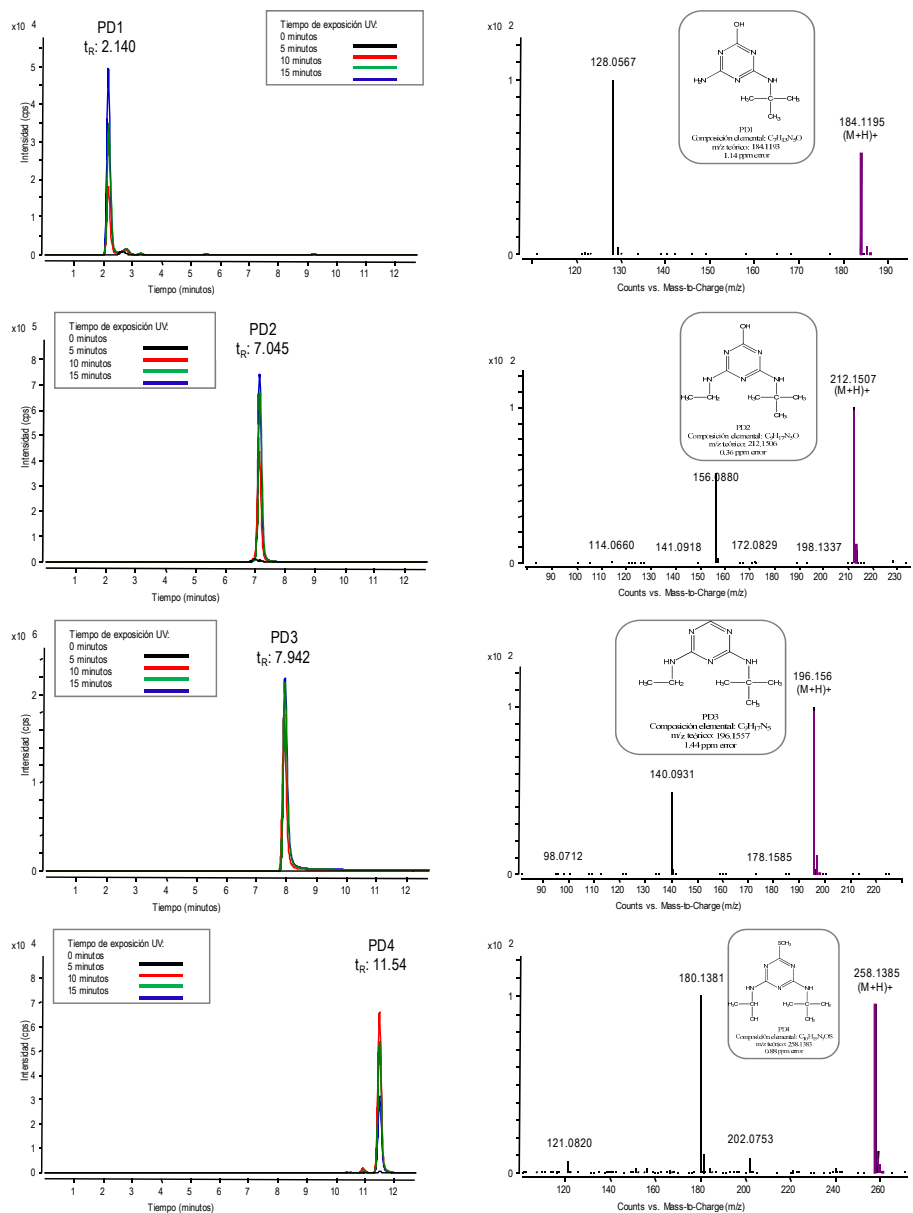


Figura 5.3.30. Superposición de los cromatogramas de iones extraídos (izquierda) y espectros de masa (derecha) de los PD5, PD6 y PD7 del terbutryn con sus fragmentos, estructura propuesta, m/z y error de masa relativo (expresado en ppm).

5.3.3.6. Predicción de la toxicidad de las triazinas y sus productos de degradación

Con el fin de evaluar la toxicidad de las triazinas y sus productos de degradación, se ha llevado a cabo la predicción de la toxicidad de los intermedios formados mediante el programa informático T.E.S.T. [259], empleando la tasa de toxicidad oral en ratas DL_{50} . Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 5.3.6. y en la Figura 5.2.31.

Tabla 5.3.6. Predicción de la toxicidad de los PDs mediante T.E.S.T.[259].

<i>Triazinas y productos de degradación</i>	<i>Oral en ratas LC_{50} (mg/L)</i>	<i>Triazinas y productos de degradación</i>	<i>Oral en ratas LC_{50} (mg/L)</i>
Ametryn	1233.31	Dimethametryn PD3	2757.55
Ametryn PD1	1360.5	Dimethametryn PD4	4025.74
Ametryn PD2	1278.22	Dimethametryn PD5	543.14
Ametryn PD3	745.88	Dimethametryn PD6	1104.28
Ametryn PD4	2125.95	Dimethametryn PD7	4025.74
Ametryn PD5	498.13	Dimethametryn PD8	2930.57
Ametryn PD6	684.27	Dimethametryn PD9	4025.74
Ametryn PD7	759.83	Dimethametryn PD10	976.23
Ametryn PD8	130.94	Dimethametryn PD11	2757.55
Ametryn PD9	1324.63	Propazine	1446.48
Atrazine	1541.4	Propazine PD1	2035.31
Atrazine PD1	1816.33	Propazine PD2	1484.71
Atrazine PD2	2125.95	Propazine PD3	2035.31
Atrazine PD3	1816.33	Propazine PD4	1484.71
Atrazine PD4	2125.95	Simazine	1247.55
Atrazine PD5	1930.58	Simazine PD1	4063.58
Atrazine PD6	1470.08	Simazine PD2	1816.33
Atrazine PD7	1930.58	Simazine PD3	1816.33
Cyanazine	741.23	Simazine PD4	1590.21
Cyanazine PD1	882.6	Terbumeton	859.26
Cyanazine PD2	703.9	Terbumeton PD1	1023.21
Cyanazine PD3	242.17	Terbumeton PD2	2395.13
Cyanazine PD4	566.56	Terbumeton PD3	1729.28
Desmetryn	1260.97	Terbuthylazine	1446.48

<i>Triazinas y productos de degradación</i>	<i>Oral en ratas LC50 (mg/L)</i>	<i>Triazinas y productos de degradación</i>	<i>Oral en ratas LC50 (mg/L)</i>
Desmetryn PD1	1615.52	Terbuthylazine PD1	5436.42
Desmetryn PD2	1360.5	Terbuthylazine PD2	5436.42
Desmetryn PD3	1234.83	Terbuthylazine PD3	2035.31
Desmetryn PD4	2360.24	Terbuthylazine PD4	2035.31
Desmetryn PD5	2932.66	Terbuthylazine PD5	1615.52
Desmetryn PD6	2125.95	Terbuthylazine PD6	2360.24
Desmetryn PD7	1177.49	Terbuthylazine PD7	1615.52
Desmetryn PD8	498.13	Terbutryn	1621.21
Desmetryn PD9	1615.52	Terbutryn PD1	2360.24
Desmetryn PD10	2052.5	Terbutryn PD2	2035.31
Dimethametryn	2451.8	Terbutryn PD3	759.83
Dimethametryn PD1	4063.58	Terbutryn PD4	2653.92
Dimethametryn PD2	988.23		

Podemos observar en la Tabla 5.3.6., que el PDs que presenta mayor toxicidad es el ametryn PD8 con 130.94 mg/L, seguido del cyanazine PD3 y del desmetryn PD8 con 242.17 y 498.13 mg/L respectivamente, tal como se muestra en la Figura 5.3.31.

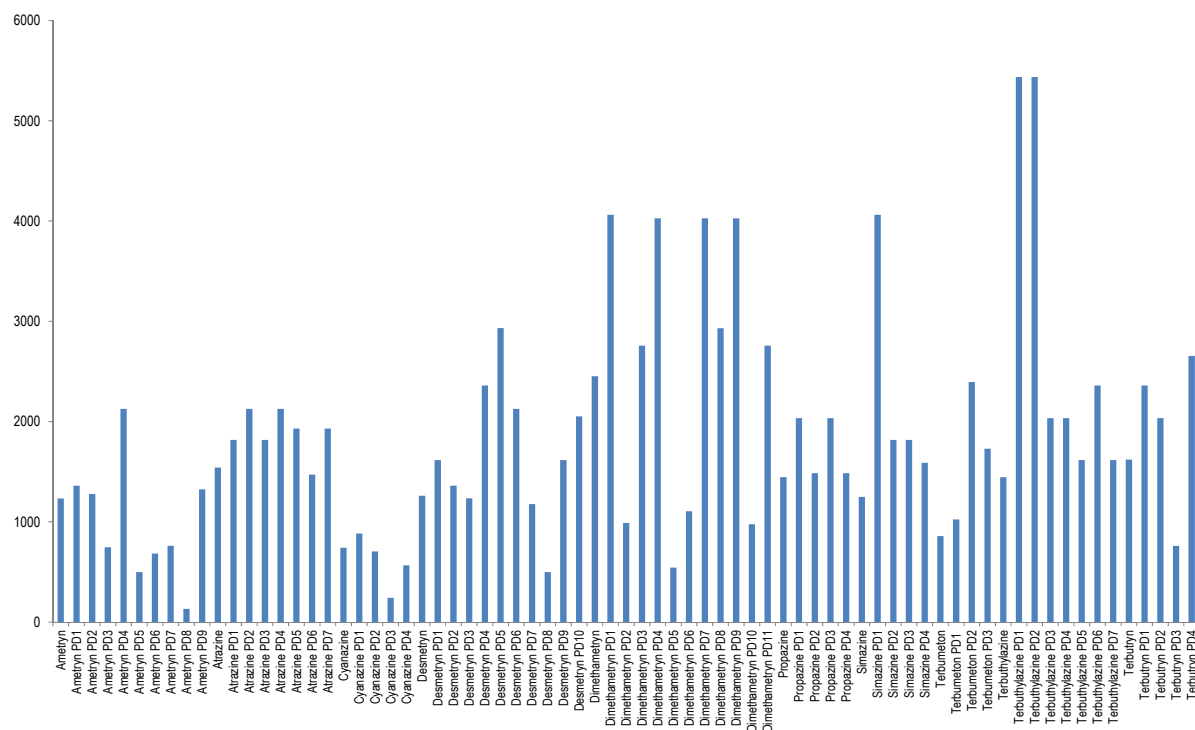


Figura 5.3.31. Toxicidad oral en ratas LD₅₀ (expresada en mg/L) para las triazinas y sus PDs.

5.3.3.7. Identificación de triazinas en aceite de oliva

En la Tabla 5.3.7., se muestran los parámetros empleados para la identificación y confirmación de las triazinas en los ensayos de degradación en aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg. Como se puede observar, la exactitud de la masa es buena, con errores menores a 2 en la mayoría de los casos.

Tabla 5.3.7. Parámetros empleados para la identificación de triazinas en los estudios de degradación en aceite de oliva mediante LC-TOFMS. Nivel de fortificación: 5 mg/Kg.

	Plaguicida	t_R (min)	Fórmula molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE
1	Ametryn	10.83	$C_8H_{14}ClN_5$	228.1277	228.1280	1.32	4
2	Atrazine	13.27	$C_9H_{17}N_5S$	216.1010	216.1005	2.31	4
3	Cyanazine	11.68	$C_9H_{13}ClN_6$	241.0958	241.0952	2.49	4
4	Desmetryn	9.04	$C_8H_{15}N_5S$	214.1120	214.1118	0.93	4
5	Dimethametryn	14.21	$C_{11}H_{21}N_5S$	256.1591	256.1593	0.78	4
6	Propazine	15.26	$C_9H_{16}ClN_5$	230.1165	230.1161	1.73	4
7	Simazine	11.07	$C_7H_{12}ClN_5$	202.0854	202.0857	1.48	4
8	Terbumeton	9.628	$C_{10}H_{19}N_5O$	226.1665	226.1669	1.77	4
9	Terbuthylazine	15.79	$C_9H_{16}ClN_5$	230.1168	230.1165	1.30	4
10	Terbutryn	12.86	$C_{10}H_{19}N_5S$	242.1436	242.1441	2.06	4

5.3.3.8. Comportamiento y estudio de degradación de las triazinas en aceite de oliva

Los ensayos de la degradación se desarrollaron en el reactor anteriormente descrito, exponiendo las muestras fortificadas de aceite de oliva a 5 y 20 $\mu\text{g/Kg}$. Las cinéticas de degradación obtenidas (Figura 5.3.32.) muestran que la degradación de todas las triazinas es relativamente lenta. Tal como se puede observar en la Tabla 5.3.8, el terbutryn y la propazine son las triazinas con un porcentaje de degradación mayor (80 % aproximadamente), mientras que la degradación del terbumeton es menor, sólo degradándose hasta 43.35% transcurrido el tiempo de exposición.

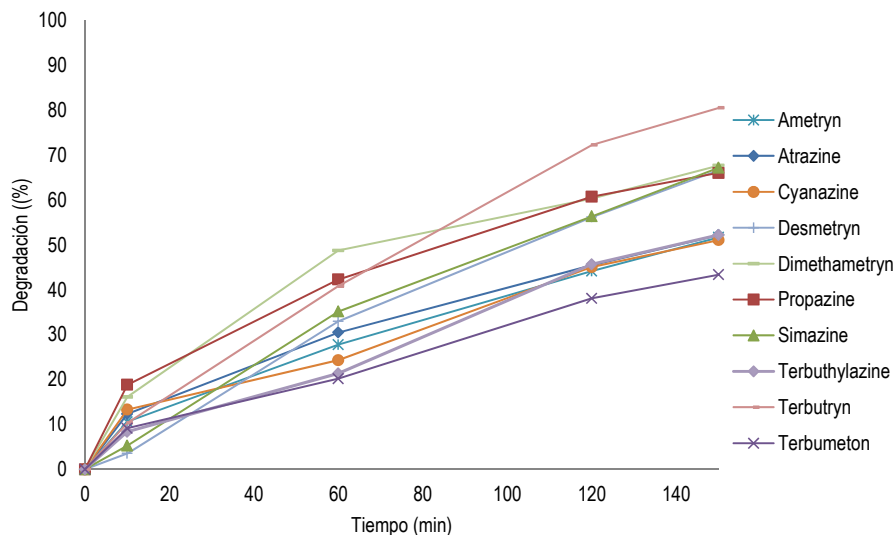


Figura 5.3.32. Curvas de degradación de los plaguicidas en aceite de oliva, dónde se representa el tiempo de exposición frente al porcentaje de degradación, aceite fortificado a 20 $\mu\text{g/Kg}$.

En estudios realizados por Martínez y col., en la degradación de triazinas en aceite de oliva [235], se encontró que la simazine y la terbutylazine tuvieron una degradación de 63.9 y 39.9% respectivamente tras 150 minutos a 20°C. Los valores encontrados en este estudio son superiores. La principal explicación que se le puede atribuir es que el aumento de la temperatura (incluso pequeñas variaciones) puede favorecer los procesos de degradación de los plaguicidas estudiados.

Tabla 5.3.8. Degradación de las triazinas estudiadas en aceite de oliva fortificado a 20 µg/Kg (expresado en porcentaje de degradación), según el tiempo de exposición ultravioleta (minutos).

	Plaguicida	Tiempo de exposición UV (minutos)				
		0	10	60	120	150
1	Ametryn	0.00	10.58	27.77	44.15	51.65
2	Atrazine	0.00	12.33	30.46	45.44	52.16
3	Cyanazine	0.00	13.30	24.32	45.05	51.03
4	Desmetryn	0.00	3.54	32.95	56.17	66.57
5	Dimethametryn	0.00	16.12	48.73	60.30	67.64
6	Propazine	0.00	18.81	42.28	60.70	66.01
7	Simazine	0.00	5.28	35.16	56.34	67.15
8	Terbuthylazine	0.00	8.36	21.34	45.66	52.17
9	Terbutryn	0.00	10.34	40.82	72.23	80.48
10	Terbumeton	0.00	9.13	20.17	38.09	43.35

5.3.3.9. Estudio cinético de la degradación de triazinas en aceite

Se representó el logaritmo neperiano del porcentaje de degradación de las triazinas frente al tiempo de exposición. Los resultados se muestran en la Figura 5.3.33, y muestran que, bajo las condiciones estudiadas en este trabajo, la degradación de las triazinas presentan un comportamiento cinético de primer orden.

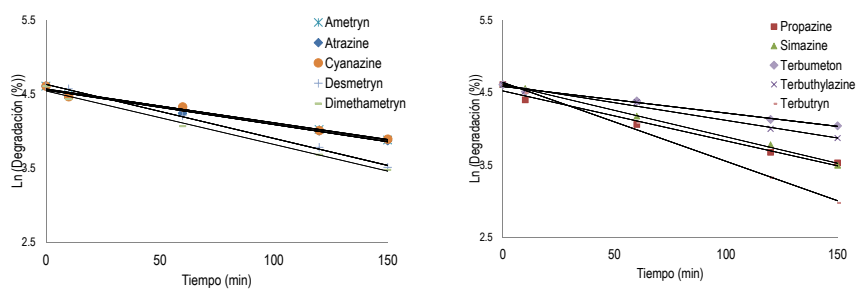


Figura 5.3.33. Demostración del comportamiento cinético de primer orden para la degradación de las triazinas en aceite de oliva fortificado a 20 µg/Kg.

A partir de las pendientes de las rectas obtenidas del ajuste por mínimos cuadrados se calculan las constantes de velocidad y los tiempos de vida media. Ambos datos juntos con los coeficientes de correlación (R^2) correspondientes a los ajustes lineales mostrados en la Figuras 5.3.33 se han incluido en la Tabla 5.3.9.

Tabla 5.3.9. Parámetros cinéticos de las triazinas en aceite de oliva fortificado a 20 $\mu\text{g/Kg}$.

	Triazinas	Coefficiente de regresión (R^2)	Ecuación*	Rango evaluado (min)	K (min^{-1}) $\times 10^3$	$t_{1/2}$ (min)
1	Ametryn	0.9937	-0.0046x+4.570	0-150	0.46	150.65
2	Atrazine	0.9870	-0.0047x+4.554	0-150	0.47	147.45
3	Cyanazine	0.9829	-0.0045x+4.566	0-150	0.45	154.00
4	Desmetryn	0.9975	-0.0073x+4.630	0-150	0.73	94.93
5	Dimethametryn	0.9914	-0.0072x+4.542	0-150	0.72	96.25
6	Propazine	0.9825	-0.0069x+4.520	0-150	0.69	100.43
7	Simazine	0.9975	-0.0073x+4.616	0-150	0.73	94.93
8	Terbuthylazine	0.9885	-0.0049x+4.607	0-150	0.49	141.43
9	Terbutryn	0.9940	-0.0109x+4.635	0-150	1.09	63.58
10	Terbumeton	0.9898	-0.0037x+4.581	0-150	0.37	187.30

* $y = \text{Ln}(\text{Degradación } (\%))$, K: Constante de velocidad, $t_{1/2}$: Tiempo de vida media

De acuerdo con los resultados, el orden de degradación de las triazinas en aceite de oliva, bajo las condiciones experimentales empleadas es el siguiente: terbutryn > desmetryn ~ simazine > dimethametryn > propazine > terbuthylazine > atrazine > ametryn > terbumeton, presentando por tanto un comportamiento muy parecido al de los estudios llevados a cabo en disoluciones acuosas.

5.3.3.10. Estudio de los productos de degradación de las triazinas en aceite de oliva virgen

La identificación de los productos de degradación en el aceite de oliva se realizó teniendo en cuenta la coincidencia de los tiempos de retención con los de los respectivos PDs encontrados en las disoluciones acuosas, junto con las medidas de masa exacta de las moléculas protonadas. En la Tabla 5.3.10. se muestran los productos de degradación de triazinas identificados en los estudios de degradación en aceite de oliva a un nivel de fortificación de 5 mg/Kg.

Tabla 5.3.10. Identificación de los PDs de las triazinas en aceite de oliva virgen fortificado usando la medida de masa exacta de la molécula protonada y los fragmentos característicos mediante LC-TOFMS. Nivel de fortificación 5 mg/Kg.

	Productos de degradación	t_R (min)	Ion	Posible Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ m/z teórica	$[M+H]^+$ m/z experimental	Error (ppm)	DBE
1	Ametryn PD5	6.216	$[M+H]^+$	$C_8H_{15}N_5$	182.1400	182.1393	4.07	4
		6.216	Frag.	$C_5H_9N_5$	140.0929	140.0925	4.28	4
2	Ametryn PD7	7.834	$[M+H]^+$	$C_9H_{17}N_5$	196.1557	196.1547	4.68	4
		7.834	Frag.	$C_5H_9N_5$	140.0933	140.0922	6.40	4
3	Desmetryn PD7	6.368	$[M+H]^+$	$C_8H_{15}N_5$	182.1400	182.1399	1.98	4
		6.368	Frag.	$C_5H_9N_5$	140.0929	140.0928	1.88	4
4	Desmetryn PD10	7.855	$[M+H]^+$	$C_9H_{17}N_5$	196.1557	196.1547	4.68	4
		7.855	Frag.	$C_5H_9N_5$	140.0933	140.0922	6.40	4
5	Dimethametryn PD10	9.020	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{19}N_5$	210.1715	210.1684	5.34	4
		9.020	Frag.	$C_5H_9N_5$	140.0935	140.0908	16.56	4
6	Terbutryn PD3	7.942	$[M+H]^+$	$C_9H_{17}N_5$	196.1557	196.1543	6.88	4
		7.942	Frag.	$C_5H_9N_5$	140.0933	140.0922	6.40	4
		7.942	Frag.	$C_3H_5N_5$	112.0617	120.0613	4.66	4
		7.942	Frag.	$C_4H_7N_3$	98.0711	98.0705	-	-

De los resultados obtenidos en las muestras de aceite de oliva virgen se deduce que seis de los sesenta tres PDs encontrados en las disoluciones acuosas fueron identificados en los ensayos en aceite de oliva. Los PDs detectados fueron ametryn PD5, ametryn PD7, desmetryn PD7, desmetryn PD11, dimethametryn PD10 y terbutryn PD3. Los resultados muestran la capacidad del método para la identificación de PDs en aceites de oliva. En las Figuras 5.3.34., 5.3.35 y 5.3.36, se muestran ejemplos de la identificación del PDs en aceite de oliva.

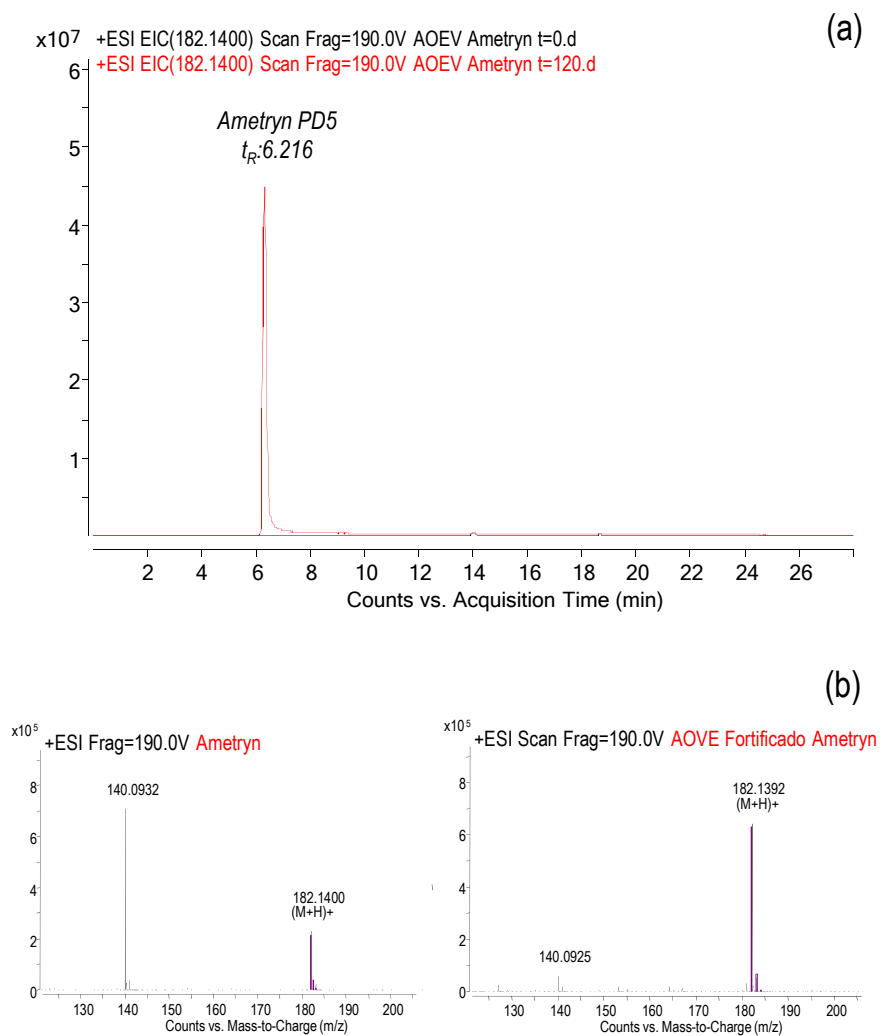


Figura 5.3.34. a). Cromatogramas totales de iones y cromatogramas extraídos del ametryn PD5 m/z 182.1400, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del PD en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

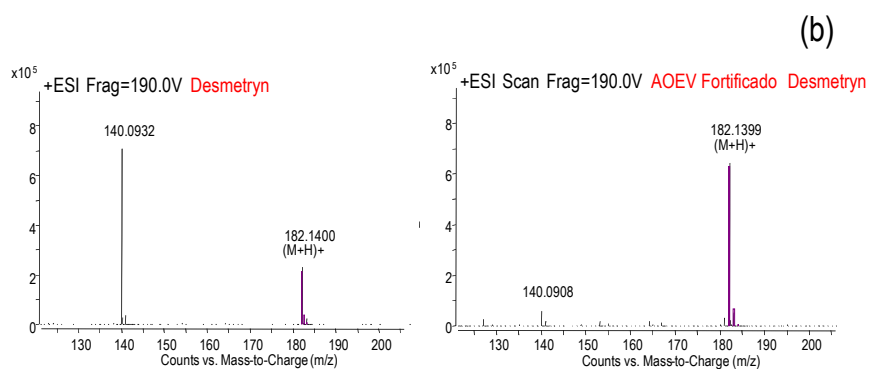
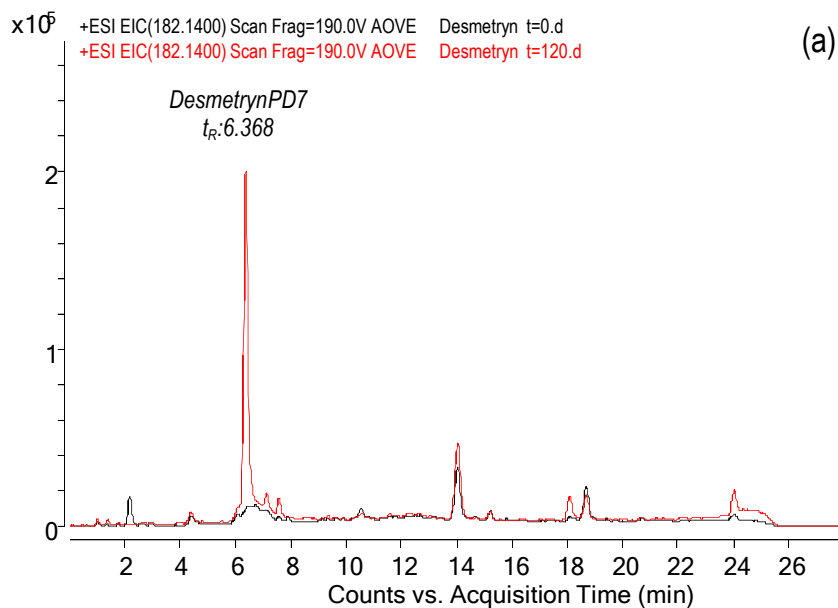


Figura 5.3.35. a). Cromatogramas totales de iones y cromatogramas extraídos del desmetryn PD8 a m/z 182.1400, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del PD en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

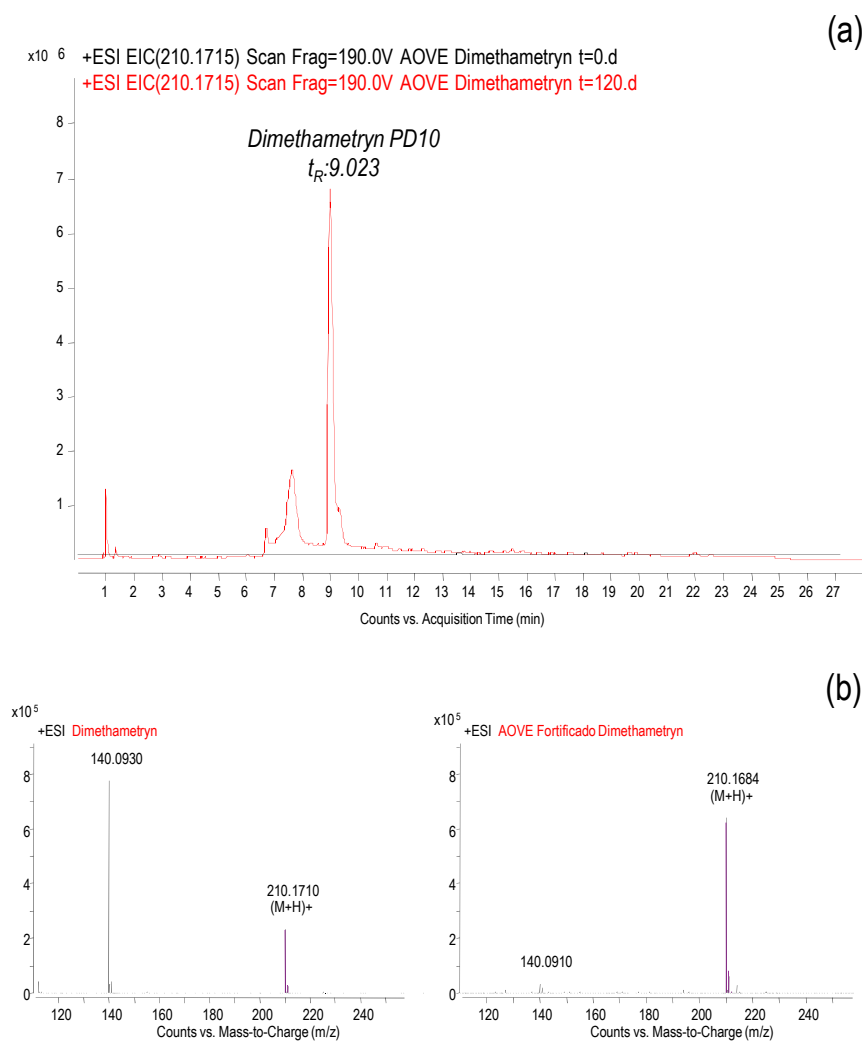


Figura 5.3.36. a). Cromatogramas totales de iones y cromatogramas extraídos del dimethametryn PD10 a m/z 210.1710, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del dimethametryn PD10 en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

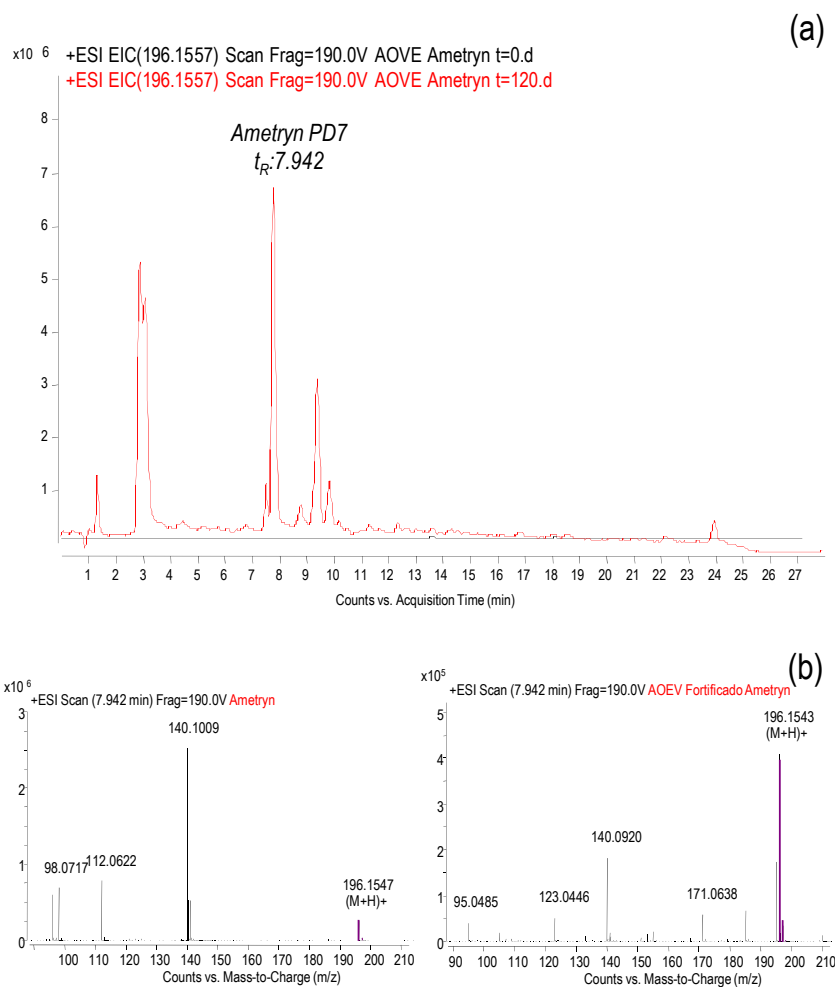


Figura 5.3.37. a). Cromatogramas totales de iones y cromatogramas extraídos del ametryn PD7 a m/z 196.1557, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del PD en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

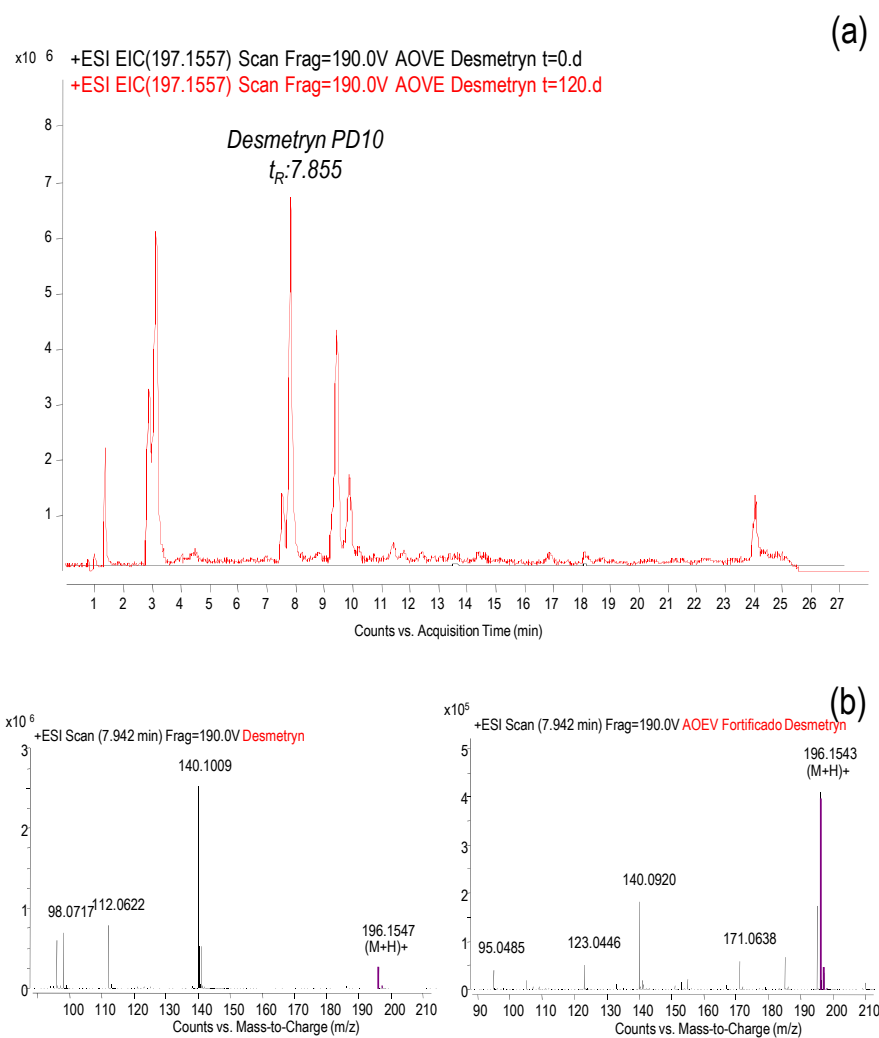


Figura 5.3.38. a). Cromatogramas totales de iones y cromatogramas extraídos del desmetryn PD10 a m/z 196.1557, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del PD en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

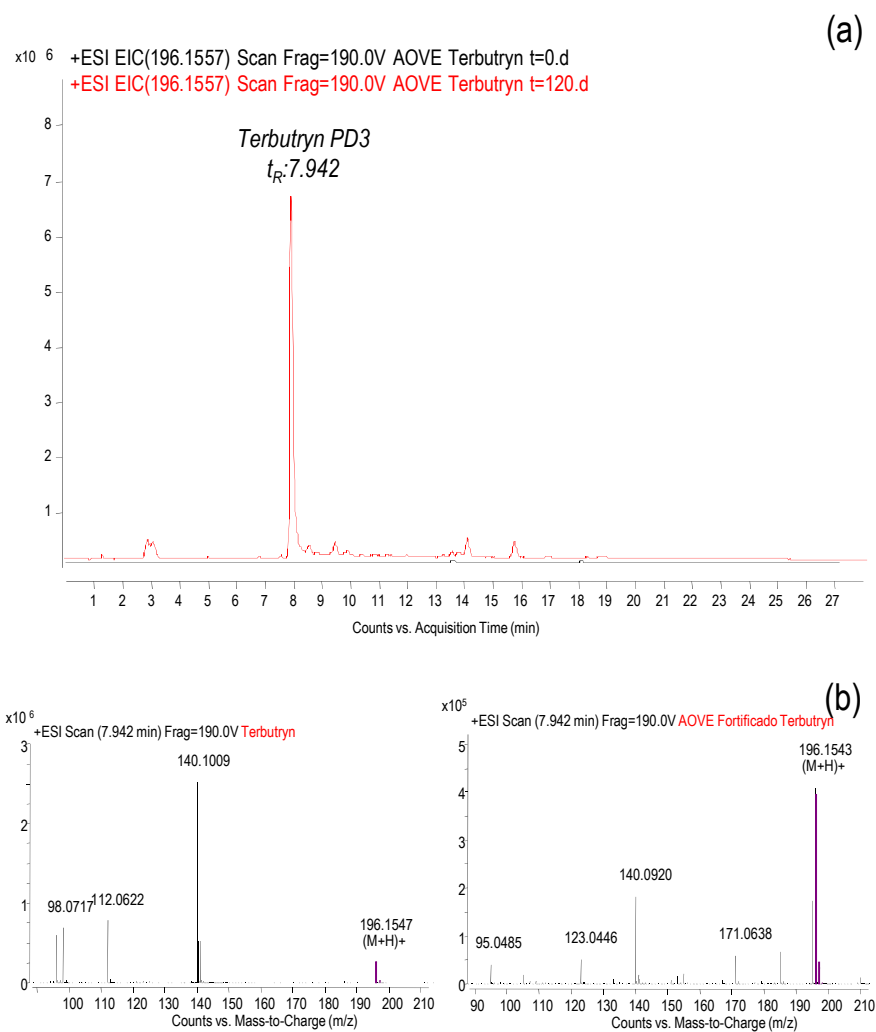


Figura 5.3.39. a). Cromatogramas totales de iones y cromatogramas extraídos del terbutryn PD3 a m/z 196.1557, en la muestra de aceite de oliva virgen fortificado a 5 mg/Kg. b). Espectros de masa exacta y fragmentos para la confirmación del PD en el aceite de oliva virgen fortificado a un nivel de concentración de 5 mg/Kg.

5.3.3.11. Comportamiento de los productos de degradación de las triazinas en aceite de oliva

De los PDs de las triazinas encontradas en el aceite de oliva, que se muestran en la Figura 5.3.40., se observa su evolución de los seis PDs identificados.

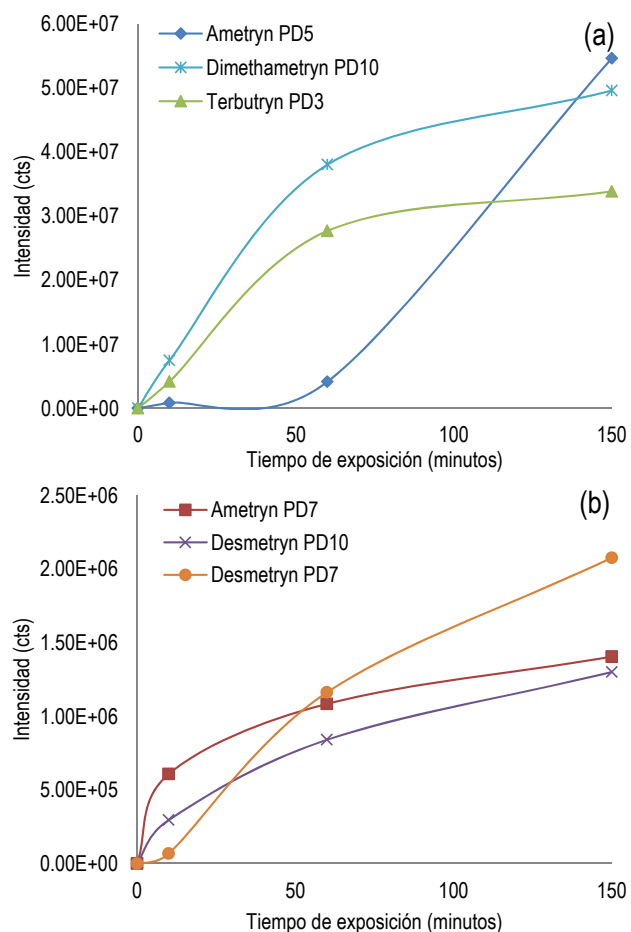


Figura 5.3.40. Comportamiento de los PDs de las triazinas encontrados en el aceite de oliva expuesto a la luz ultravioleta.

En la figura se puede observar la evolución de los PDs, en el que se confirma que a tiempo 0, no se encontraban dichos PDs. Transcurrido un tiempo, se van formando y alcanzan su máximo desarrollo a los 150.

En cuanto a la toxicidad de los PDs encontrados en el aceite de oliva, se han generado productos de degradación más tóxicos que el plaguicida originario, ya que el ametryn tiene una toxicidad de 1233.31 mg/L, desmetryn 1260.97 y su PD es de 498.13. Para dimethametryn su toxicidad es de 2451.80 y para su producto de degradación PD10 es de 2052.5. Para el terbutryn su toxicidad de 1621.21 mg/L mientras que la de su productor de degradación PD3 es de 759.83 mg/L.

5.3.3.12. Estudio comparativo de la degradación de las triazinas en aceite de oliva

En la Tabla 5.3.10., se han comparado los resultados de esta memoria de investigación, con los estudios realizados por Martínez y col. [106, 235], en la que estudiaron, la degradación de algunos de los plaguicidas encontrados en el olivar, teniendo en cuenta los niveles de fortificación de aceite, tiempo de exposición a la luz UV y temperaturas, en la que obtuvieron degradaciones en el rango del 7-80%.

El estudio realizado en esta memoria doctoral, los niveles de fortificación fueron dos de 0.20 y 5.00 mg/Kg, el tiempo de exposición a la luz UV de 150 minutos, se mantuvo la temperatura, se mantuvo constante en todos nuestros análisis a $\pm 27^{\circ}\text{C}$, obteniéndose rangos de degradación de 43.35 – 80.48%.

Tabla 5.3.10. Tabla comparativa con los resultados obtenidos en la degradación de plaguicidas en aceite de oliva virgen.

	Plaguicidas	Martínez y col.[235]				Estudio realizado	
		N.F.	t (min)	Temperatura (°C)	% degradación	N.F.	t=150 (minutos)
1	Ametryn	-	-	-	-	0.2	51.65
2	Atrazine	-	-	-	-	0.2	52.16
3	Cyanazine	-	-	-	-	0.2	51.03
5	Desmetryn	-	-	-	-	0.2	66.57
4	Dimethametryn	-	-	-	-	0.2	67.64
6	Propazine	-	-	-	-	0.2	66.01
7	Simazine	2.81	150	20	63.9	0.2	67.15
8	Terbumeton	-	-	-	-	0.2	43.35
9	Terbutilazine	1.52	150	20	39.9	0.2	52.17
10	Terbutryn	1.21	150	20	25.7	0.2	80.48

N.F. Nivel de fortificación (mg/Kg)

5.3.4. Conclusiones

Debido a la frecuente presencia de residuos de triazinas en las muestras de aceite de oliva virgen de España analizadas y la elevada estabilidad y resistencia a la degradación de ésta familia de herbicidas, se ha realizado un estudio detallado de la degradación mediante la exposición a la luz ultravioleta de 10 triazinas (ametryn, atrazine, cyanazine, desmetryn, dimethametryn, propazine, simazine, terbumeton, terbuthylazine y terbutryn) tanto en disoluciones acuosas y en aceite de oliva.

A partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han degradado casi todas las triazinas a excepción del terbumeton que sólo se degradó 46.40%, al término de los 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta en disoluciones acuosas. El comportamiento cinético de la degradación, para el 70% de los mismos, presentaba un tiempo de vida media $t_{1/2}$ menor de 3 minutos.
- En el caso de los estudios en aceite de oliva, se encontró que el 50% de las triazinas presentan un $t_{1/2}$ menor a 120 minutos, por lo que las triazinas son más resistentes a la luz ultravioleta, en comparación con otros plaguicidas, debido a la gran estabilidad química de esta familia de herbicidas.
- Mediante el empleo de LC-TOFMS, se han identificado un elevado número de PDs (63) de las triazinas en disoluciones acuosas, siendo algunos de ellos propuestos por primera vez en este trabajo. También se buscaron los PDs formados en aceite de oliva, identificándose seis de ellos.
- En la predicción de la toxicidad, de los PDs se observa que son más tóxicos que el producto de partida, encontrándose para los PDs identificados en el aceite de oliva en el caso del ametry PD5 y Ametryn PD7 que son más tóxicos que el ametryn.

- 5.4. Estudio del tratamiento con radiación UV en aceites de oliva de distintas categorías comerciales y evaluación de los principales parámetros de calidad y componentes minoritarios

Resumen

Una vez confirmada la utilidad del tratamiento UV para la degradación de plaguicidas en aceite de oliva, en este estudio se ha evaluado el efecto del tratamiento UV en la composición del aceite de oliva de diferentes categorías comerciales (aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva y aceite de orujo), basado en el estudio de la evolución de los principales parámetros de calidad (acidez, índice de peróxidos, y K_{232} y K_{270}) al someterse a un tratamiento UV de 150 minutos. Para el caso concreto del aceite de oliva virgen extra, debido a su valor añadido por su composición química, se han llevado a cabo otros ensayos adicionales para evaluar en detalle el impacto del tratamiento UV sobre su composición. Entre los ensayos realizados se ha estudiado: el perfil de los ácidos grasos, el contenido individual y total de polifenoles, el contenido en tocoferoles, el contenido de pigmentos (clorofilas y carotenos), el contenido en compuestos volátiles y una prueba de análisis sensorial mediante panel de cata. Se ha encontrado que en ninguna de las cuatro variedades comerciales de aceite de oliva estudiadas los principales parámetros de calidad no se ven afectados sustancialmente por el tratamiento UV. En todas ellas, se produce un incremento no muy significativo al final de la exposición UV, de forma que no se superaban los valores umbrales que establece la norma comercial. Por lo que respecta al estudio detallado de la composición del aceite de oliva virgen extra, sí que se observan algunos cambios de relevancia. En el caso del perfil de ácidos grasos este permanece completamente estable sin alteraciones significativas, lo que confirma que el tratamiento no resulta muy agresivo para la composición general de la grasa. En el caso del contenido de polifenoles y de tocoferoles se produce una degradación a lo largo del tratamiento aunque al final del mismo todavía queda más del 60 % de los polifenoles iniciales y alrededor del 35 % de los tocoferoles. En el caso concreto de los polifenoles, la degradación de la clase de polifenoles más abundantes en aceite de oliva (oleuropeína) da lugar a compuestos fenólicos más sencillos también presentes en el aceite (hidroxitirosol y ácido elenólico).

Por este motivo, el contenido total de polifenoles no se ve drásticamente afectado después del tratamiento. Para el caso de los pigmentos fotosintéticos se observó un descenso a lo largo del tratamiento en el caso de las clorofilas hasta 84.38%, así como la formación y degradación de carotenoides. Por último, se pueden establecer correlaciones entre la disminución del contenido en volátiles (que proporcionan las características organolépticas) y el análisis sensorial. El tratamiento da lugar a un defecto sensorial de rancidez, que fue percibido por el panel de cata, comprobándose su presencia mediante la identificación de algunos aldehídos como el 2-metilbutanal y el 1-penten-3-ol, que confieren el olor rancio a los aceites, es por tal motivo que haría que el aceite de oliva virgen extra tratado no siguiese perteneciendo a dicha categoría comercial. Por tanto el tratamiento UV ha demostrado no afectar la composición del aceite de oliva salvo la excepción de las propiedades organolépticas del análisis sensorial.

5.4.1. Introducción

El aceite de oliva virgen es un componente básico de la dieta mediterránea. Se obtiene a partir del fruto de varios cultivares de olivo (*Olea europea* L.), y es conocido por sus efectos beneficiosos sobre la salud, y posiblemente incluso jugar un papel en la prevención de diversas enfermedades [11]. Para que un aceite de oliva sea clasificado en sus distintas categorías comerciales, deben cumplir la normativa vigente en cuanto a sus criterios de calidad y pureza, pero además contienen otros componentes minoritarios que ayudan a equilibrar su composición del aceite como son los componentes minoritarios con potencial antioxidante (polifenoles, tocoferoles, etc).

El análisis sensorial es uno de los criterios de calidad más importante del aceite de oliva. El método oficial es utilizar un panel de expertos altamente especializados para analizar el sabor y los otros atributos sensoriales [27]. El análisis sensorial es una de las herramientas más importantes para la clasificación de los aceites de oliva en las diferentes categorías comerciales de virgen extra, virgen y aceite de oliva. El objetivo de nuestra investigación es evaluar la influencia de la luz ultravioleta en los criterios de calidad del aceite de oliva y otros compuestos importantes presentes en el aceite de oliva y su efecto sobre la calidad.

Además, tanto los compuestos fenólicos como los tocoferoles y los pigmentos clorofílicos están implicados en diferentes mecanismos que proporcionan una defensa efectiva contra los radicales libres [286]. Estos compuestos desempeñan un papel importante en la prevención de la oxidación [287] y la estabilidad del aceite de oliva [288]. El contenido de antioxidantes depende de muchos factores tales como la variedad de oliva, las condiciones climáticas, ambientales, y condiciones de la agricultura, la madurez de la planta, tiempo de procesamiento, y el almacenamiento del aceite. Debido a su aroma, sabor, color y propiedades nutritivas, el aceite de oliva se considera el mejor de todos los aceites de origen vegetal. Por estas razones, es importante controlar todos

los procesos de oxidación y factores que pueden afectar a su calidad (temperatura, oxígeno, luz, y metales) [289, 290], así como, los procesos de oxidación que influye en la calidad del aceite, por tanto, esta tesis se estudia el comportamiento de los componentes frente a la luz ultravioleta, con el fin de minimizar el riesgo de afectar la calidad del aceite de oliva.

En los capítulos anteriores del presente trabajo, se ha estudiado en detalle el comportamiento y degradación de los principales plaguicidas empleados en el olivar tanto en disolución acuosa como en aceite de oliva. Una vez confirmada la utilidad del tratamiento UV para la degradación de plaguicidas en aceite de oliva, en este capítulo 5.4 se ha evaluado el efecto del tratamiento UV en la composición del aceite de oliva de diferentes categorías comerciales (aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva y aceite de orujo), basado en el estudio de la evolución de los principales parámetros de calidad (acidez, índice de peróxidos, y K_{232} y K_{270}) al someterse a un tratamiento UV de 150 minutos. Para el caso concreto del aceite de oliva virgen extra, debido a su valor añadido por su composición química, se han llevado a cabo otros ensayos adicionales para evaluar en detalle el impacto del tratamiento UV sobre su composición. Entre los ensayos realizados se ha estudiado: el perfil de los ácidos grasos, el contenido individual y total de polifenoles, el contenido en tocoferoles, el contenido de pigmentos (clorofilas y carotenos), el contenido en compuestos volátiles y una prueba de análisis sensorial mediante panel de cata.

5.4.2. Experimental

5.4.2.1. Equipo para radiación ultravioleta

Los experimentos se realizaron en un fotoreactor integrado (ver Figura 5.4.1), descrito en detalle el apartado de instrumentación, con una lámpara UV inmersa en el reactor de 500 mL. Se empleó un termómetro para controlar la temperatura del reactor durante la exposición UV.

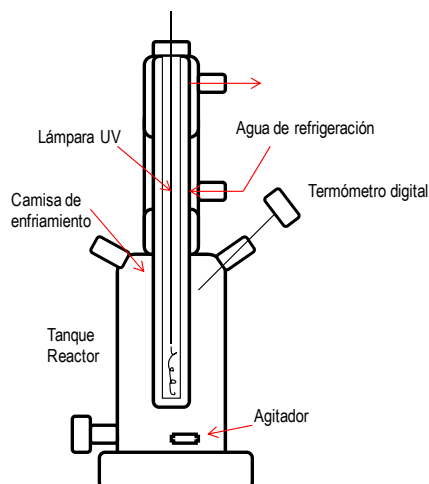


Figura 5.4.1. Montaje del equipo empleado para llevar a cabo los estudios de degradación UV.

Los experimentos se realizaron a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, mediante el empleo de un sistema de refrigeración. En el transcurso de los experimentos se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de exposición: 0, 10, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. Los experimentos se realizaron por triplicado para obtener el promedio de los resultados.

5.4.2.2. Determinación de parámetros de calidad de aceite de oliva

Todos los análisis realizados en este capítulo se llevaron a cabo siguiendo los ensayos para la caracterización de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva establecidos por la normativa del COI [27], o el reglamento de la UE [21]. Las muestras empleadas han sido aceite de oliva virgen extra (AOEV), aceite de oliva virgen (AOV), aceite de oliva (AO) y refinado de orujo (ORUJO), adquiridas en diferentes supermercados de la localidad, salvo la de orujo obtenida de una fábrica. La medida de los índices físico-químicos de calidad de un aceite de oliva junto con la valoración organoléptica, nos permiten clasificar a los aceites de oliva según las diferentes categorías. Los parámetros físico-químicos se han analizado desde el tiempo 0 a 150 minutos de exposición (0, 10, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos), la temperatura del reactor no superó los $27^{\circ}\text{C} \pm 1$. Todos los reactivos empleados en la medida de estos índices han sido de calidad analítica reconocida.

A) Grado de acidez

El grado de acidez determina la cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite y se expresa en porcentaje de ácido oleico. El procedimiento consiste en disolver la muestra de aceite en una mezcla de éter etílico y etanol (1:1 v/v) previamente neutralizada y valorar con disolución etanólica contrastada de hidróxido potásico 0.1 N, hasta el viraje del indicador fenolftaleína. El peso de la muestra se toma en función del grado de acidez previsto, 20 g si se prevé un grado de acidez inferior a 1 y 10 g si el grado de acidez está comprendido entre 1 y 4 [28]. Para determinar la acidez, se emplea la Ecuación 5.4.1.:

$$\text{Grado de acidez} = \frac{V.c.M}{10.P} \quad (\text{Ecuación 5.4.1.})$$

siendo,

Grado de acidez: expresado en % de ácido oleico

V: Volumen de la disolución de potasa alcohólica consumida en la valoración (mL)

C: Concentración exacta de la disolución de potasa alcohólica (N)

M: Peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (Ácido oleico 282.27)

P: Peso de la muestra de aceite (g)

B) Índice de peróxidos

El índice de peróxidos valora el estado de oxidación inicial de un aceite y hace referencia a la cantidad (expresada como miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de hidroperóxidos en la muestra, que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas en el Reglamento [28]. El yodo liberado se valora con disolución valorada de tiosulfato sódico.

En un matraz con cierre esmerilado se pesan 2 g de aceite y se disuelven en 25 mL de una disolución de cloroformo: ácido acético (10:15 v/v) y se añade 1 mL de una disolución saturada de yoduro potásico. Se cierra el matraz, se agita 1 minuto y se mantiene en la oscuridad 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden 75 mL de agua destilada y se valora el yodo liberado con una disolución de tiosulfato sódico 0.01 N. Simultáneamente se realiza una prueba en blanco para comprobar el estado de los reactivos.

El índice de peróxidos se calcula mediante la Ecuación 5.4.2:

$$I.P. = \frac{(V - V') \cdot N \cdot 1000}{P} \quad (\text{Ecuación 5.4.2.})$$

siendo,

IP: Índice de peróxidos expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de aceite

V: Volumen de la disolución de tiosulfato sódico empleado en el ensayo (mL)

V': Volumen de la disolución de tiosulfato sódico como prueba en blanco (mL)

N: Normalidad de la disolución de tiosulfato sódico

P: Peso de la muestra de aceite (g)

C) Absorbancia en el UV (K_{232} y K_{270})

La prueba espectrofotométrica de absorción en el UV, sirve como indicador del estado de conservación de un aceite y de las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos. La determinación de la absorbancia a 232 nm, indica al igual que el índice de peróxidos estadios de oxidación primarias en el aceite, la absorbancia a 270 nm permite detectar la presencia de compuestos de oxidación secundaria del aceite.

El valor de esta absorbancia se expresa en extinción específica, extinción de una disolución de la materia grasa al 1% en el disolvente determinado, en cubeta de 1 cm de espesor. El procedimiento consiste en pesar 0.25 g de aceite en un matraz aforado de 25 mL. Se enrasa con ciclohexano y se homogeniza. Se lee la absorbancia de la disolución resultante a 270 nm frente a ciclohexano [28]. Se expresa la extinción específica a 270 nm, con la Ecuación 5.4.3.:

$$K\lambda = \frac{A\lambda}{b \cdot c} \quad (\text{Ecuación 5.4.3.})$$

siendo,

$K\lambda$: coeficiente de extinción específica a la longitud de onda dada

$A\lambda$: Absorbancia a la longitud de onda dada

b: Espesor de la cubeta (cm)

c: concentración de la disolución (g/100 mL)

5.4.2.3. Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases

El método está basado en la separación y determinación por cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, según el Reglamento (CEE) N°2568/91[21]. El método está basado en la separación y determinación por cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Es aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva con un contenido en ácidos grasos libres inferior al 3.3 %. El hidróxido potásico no produce la esterificación de los ácidos grasos libres. Los ésteres metílicos se forman por la transesterificación con una solución metanólica de hidróxido potásico como una fase intermedia antes que se produzca la saponificación.

El procedimiento es el siguiente: en un tubo roscado de 5 ml se pesan aproximadamente 0.1 g de la muestra de aceite. A continuación, se agregan 2 ml de hexano y se agita. Después, se añaden 0.2 ml de la solución metanólica 2 N de hidróxido potásico, se cierra el tubo con el tapón y se agita enérgicamente durante 30 segundos. Se deja en reposo hasta que la fase superior resulte nítida. Se decanta la capa superior, que es la que contiene los ésteres metílicos y a continuación se inyecta en el cromatógrafo de gases.

El método cromatográfico empleado tiene las siguientes características. El flujo del gas portador (Helio) debe ser adecuado para permitir la elución del linoleato de metilo en un tiempo mínimo de 25 minutos. La presión de entrada y el flujo necesario para conseguirlo varía según la columna y el instrumento utilizado. Es necesario mantener el flujo constante durante todo el análisis. Las condiciones de temperatura son las siguientes: temperatura del horno: 185 °C, temperatura de la cámara de inyección: 220 °C, temperatura del detector: 220 °C. Se inyecta aproximadamente 1 µl de la disolución de ésteres metílicos utilizando una jeringa. Una vez obtenido el cromatograma se procede a la identificación de los picos. Para la identificación de los picos, se utilizará el criterio basado en los tiempos de retención. Si nos referimos exclusivamente a los ácidos que entran normalmente en la composición de las grasas naturales, sus ésteres aparecen en el cromatograma en orden creciente de sus átomos de carbono y a su

insaturación. De esta forma, el éster del ácido palmítico (16:0) aparece delante del éster del ácido esteárico (C18:0), y el resto de ésteres C18 aparecen en el orden estearato (18:0), oleato, linoleato. El éster del ácido aráquico (C20:0), usualmente, aparece antes del linolénico (C18:3) pero, puede ocurrir lo contrario, en algunos casos, dependiendo del tipo de columna y de las condiciones de su utilización; o incluso superponerse el uno al otro.

La determinación cuantitativa se llevó a cabo el método de normalización de áreas. Para calcular el contenido de un componente dado *i* (expresado como porcentaje en masa de ésteres metílicos), se divide su área de su pico entre la suma de las áreas de todos los picos, aplicando la Ecuación 5.4.4.:

$$\% \text{ componente } i = \frac{A_i}{\sum A} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 5.4.4.})$$

siendo:

A_i : área del pico correspondiente al componente *i*

$\sum A$: suma de las áreas de todos los picos integrados

5.4.2.4. Determinación del contenido en compuestos fenólicos

Se realizaron dos ensayos: el contenido total de polifenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu y el estudio individual de cada una de las especies en aceite de oliva

empleando extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.

A) Determinación de polifenoles totales

La determinación de los polifenoles totales se ha realizado de acuerdo con el método descrito por Vázquez y col. [46], introduciendo como modificación la utilización del reactivo Folin-Ciocalteu en vez de Folin-Denis. El procedimiento consta de dos partes: una extracción de los polifenoles del aceite de oliva y su posterior determinación colorimétrica.

Obtención del extracto de polifenoles: Se disuelven 10 g de la muestra de aceite en 50 mL de hexano y se extraen con un volumen de 3 x 10 mL de una disolución de metanol:agua (60:40 v/v) en un embudo de decantación que se mantiene en agitación 2 minutos. Se deja reposar para separar por decantación la fase hidroalcohólica que se recoge directamente en un matraz aforado de 50 mL que se enrasa con agua destilada.

Determinación colorimétrica de los polifenoles: El reactivo de Folin-Ciocalteu está constituido por una mezcla de ácidos fosfomolibdicos y fosfowolfrámicos que son reducidos por los polifenoles en medio básico generando una mezcla de óxidos azules de molibdeno y wolframio cuya intensidad es proporcional a la cantidad de polifenoles presentes.

El procedimiento es el siguiente: en un matraz aforado de 50 mL se adicionan 35 mL de agua destilada, 5 mL de extracto de polifenoles y 2.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Se agita para homogeneizar y tras 3 minutos se añaden 5 mL de una disolución saturada de carbonato sódico.

Se lleva el volumen a 50 mL con agua destilada, se mezcla todo bien y tras 1 hora de reposo se mide la absorbancia a 725 nm, de una alícuota filtrada en una cubeta de 1 cm de paso de luz. Como blanco se utiliza una disolución preparada de la misma manera pero sin adicionar el extracto de polifenoles.

Para su cuantificación se realiza una curva patrón, procediendo de igual forma que en el análisis pero sustituyendo el extracto de polifenoles por disoluciones de ácido cafeico de concentración conocida. Las concentraciones de las disoluciones han estado comprendidas entre 30-450 mg de ácido cafeico por 50 mL de disolución. Los resultados se expresan como mg de ácido cafeico por Kg de aceite.

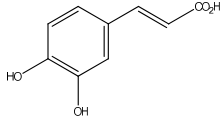
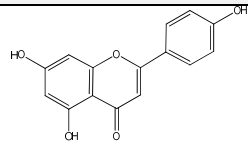
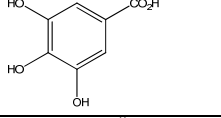
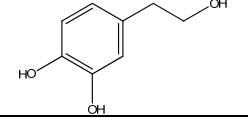
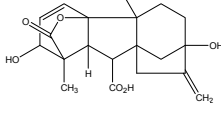
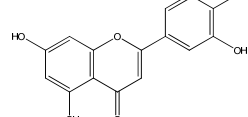
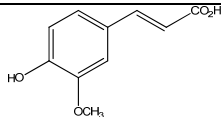
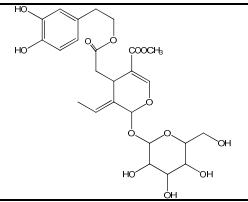
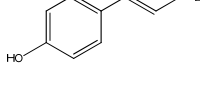
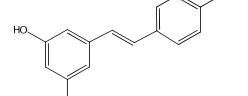
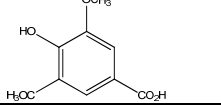
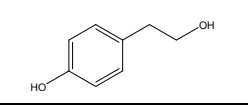
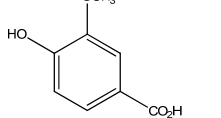
B) Perfilado (individual) de polifenoles mediante cromatografía de líquidos

Los patrones de los polifenoles empleados se obtuvieron de Sigma-Aldrich® (Madrid, España) y Extrasynthese (Francia). Para optimizar la separación e identificación de los polifenoles estudiados mediante LC-TOFMS, se prepararon disoluciones concentradas (500 a 1000 mg/L) de cada polifenol en metanol y se almacenaron en el congelador (-20°C). Se preparó disolución patrón (mezcla) de todos los compuestos tomando el volumen correspondiente para que la concentración de cada uno de los patrones en la mezcla fuera de 1 mg/L, empleando como disolvente una mezcla al 20% de metanol/agua (v/v). En la Tabla 5.4.1., se muestran las estructuras de los polifenoles estudiados. El ensayo de degradación de polifenoles se realizó con aceite de oliva virgen extra comercializado en la provincia de Jaén (España).

Para el aislamiento y preconcentración de la fracción de polifenoles se empleó un método de extracción en fase sólida con cartucho Diol basado en el trabajo de Carraco-Pancorbo y col. [291]. La extracción consiste en pasar a través del cartucho SPE previamente acondicionada con 10 mL de metanol y 10 mL de hexano, 3 g de aceite de oliva virgen extra disuelto en 3 mL de hexano. Después de eliminar la fracción no polar con 15 mL de hexano, los compuestos fenólicos se recuperan con 10 mL de metanol. El extracto final se evapora en un sistema con corriente de nitrógeno, utilizando un Turbo Vap LV, a una presión de 5 psi junto con un baño de agua a 27°C y el residuo se reconstituye en 3 mL (1 mL de metanol y 2 mL de agua Milli-Q), con ayuda de un filtro de 0.45µm de poro (PTFE filter, Millex FG, Millipore, Milford, MA). Se trasvasa a un vial y se conserva en frío hasta su análisis mediante LC-TOFMS. En la Figura 5.4.2.,

muestra el esquema del proceso llevado a cabo en la extracción mediante el método SPE.

Tabla 5.4.1. Nombre y estructura de los polifenoles incluidos en el estudio.

	Nombre	Estructura		Nombre	Estructura
1	Ácido cafeico		8	Apigenina	
2	Ácido gálico		9	Hidroxitirosol	
3	Ácido giberélico		10	Luteolina	
4	Ácido ferúlico		11	Oleuropeína	
5	Ácido p-cumárico		12	Resveratrol	
6	Ácido siríngico		13	Tirosol	
7	Ácido vanílico				

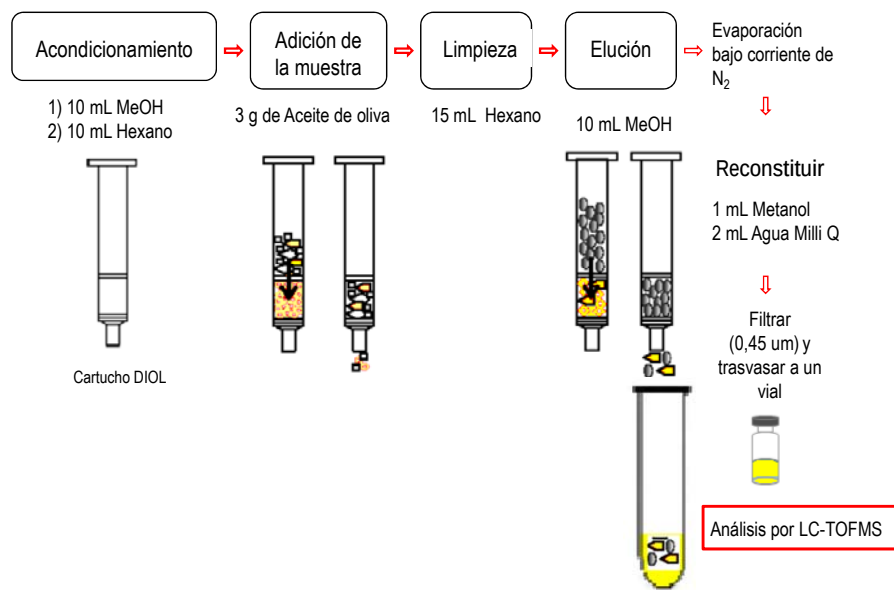


Figura 5.4.2. Esquema del método de extracción en SPE, empleado para la extracción y preconcentración de polifenoles de aceite de oliva virgen.

La identificación y cuantificación de los polifenoles individuales se llevó a cabo mediante LC-TOFMS, que permitía llevar a cabo medidas de masas exactas de iones de interés de forma sensible y selectiva. El sistema LC-TOFMS empleado disponía de un equipo UHPLC (Agilent 1290 Infinity), que constaba de una bomba binaria, un muestreador automático y un desgasificador. Este sistema HPLC estaba conectado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent TOF 6220 (Agilent Technologies) a través de una interfase/fuente de ionización electrospray (ESI) que operaba en modo de ionización negativo. En la Tabla 5.4.2, se presenta las condiciones cromatográficas empleadas. El método cromatográfico consistió en un gradiente de elución con agua con 0.1% de ácido fórmico como disolvente A y acetonitrilo (de calidad LC-MS) como disolvente B. El método empezaba con un 10% de B, que se mantiene constante

durante 5 min, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B en 30 minutos. Se incluye al final una etapa de equilibrado de columna de 10 minutos después de cada análisis.

Tabla 5.4.2. Condiciones cromatográficas seleccionadas.

<i>Condiciones de la Cromatografía Líquida</i>	
Columna	Columna analítica C18 de 50 mm × 4.6 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C18)
Flujo	Fase móvil fue de 0.5 mL/ min
Volumen de inyección	20.0 µL
<i>Espectrómetro de masas (TOFMS)</i>	
Voltaje del capilar	2500 V
Gas de secado	9 L/ min
Temperatura del gas	325 °C
Presión del nebulizador	40 psi
Voltaje del fragmentador	140 V
Rango de m/z	50-1000 Da

Los experimentos de degradación de los polifenoles en aceite de oliva virgen extra, se realizaron a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Se tomaron 6 alícuotas para monitorizar el proceso. Éstas alícuotas (de 3 gramos aproximadamente) se extrajeron del reactor a tiempo 0, 10, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. Cada muestra de (3 g) se sometía al tratamiento de muestra para la extracción y preconcentración de polifenoles de aceite de oliva. Para el estudio, se emplearon cromatogramas de iones extraídos (EICs), correspondientes a la moléculas desprotonadas ($[\text{M}-\text{H}]^-$) con una ventana de extracción de masa de 20 mDa. Esta operación se llevaba a cabo para los distintos tiempos de exposición y los picos de cada uno de los EICs eran integrados, y su área representada frente al tiempo de exposición.

5.4.2.5. Determinación de tocoferoles

Se adquirió el patrón de α -tocoferol de Sigma-Aldrich. Se preparó el patrón de α -tocoferol (250 mg/L) en acetonitrilo y se conservó en el congelador (-20°C), para estudiar la separación e identificación del α -tocoferol, mediante LC-TOFMS. El ensayo de degradación de los tocoferoles se realizó con un aceite de oliva virgen extra de la última campaña comercializado en la provincia de Jaén (España). Para llevar a cabo el análisis, la muestra de aceite se centrifugó para eliminar los sólidos en suspensión. A continuación, se procedió a realizar una dilución de la muestra en metanol (1:25). La disolución resultante se filtraba a través de un filtro de 0.45 μ m de tamaño de poro (PTFE filter, Millex FG, Millipore, Milford, MA) y se trasvasaba a un vial de vidrio de 2 ml color topacio, para ser analizadas de inmediato debido a la inestabilidad de los tocoferoles.

El equipo empleado para los análisis es un sistema HPLC que consta de un equipo de desgasificación a vacío, inyector automático y una bomba binaria) (Agilent 1290, Infinity). Este sistema estaba conectado a espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent TOF 6220 (Agilent Technologies) equipado con una fuente de ionización APCI (Ionización química a presión atmosférica) para poder llevar a cabo el análisis de tocoferoles de forma sensible ya que la fuente convencional electrospray no permite la detección de este tipo de compuestos.

El método cromatográfico empleando consistió en un gradiente de elución con metanol como disolvente A e isopropanol como disolvente B. El método HPLC empleado era un gradiente de 35 minutos que se describe a continuación: empezaba con 50% de B que se mantenía constante durante 5 min, seguido de un gradiente hasta el 70% de B hasta el minuto 10; luego hasta 90% hasta el minuto 20, seguido de un incremento final hasta el 100% B en el minuto 30, y este 100% B se mantiene constante hasta el minuto 35. Por último, se incluyó una etapa final de equilibrado de columna de 10 minutos después

de cada análisis. En la Tabla 5.4.3., se muestran las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Tabla 5.4.3. Condiciones cromatográficas seleccionadas.

<i>Condiciones de la Cromatografía Líquida</i>	
Columna	Columna analítica C18 de 150 mm × 4.6 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse Plus-C18)
Flujo	Fase móvil fue de 0.4 mL/ min
Volumen de inyección	20.0 µL
<i>Condiciones del TOFMS</i>	
Voltaje del capilar	3000 V
Gas de secado	5 L/ min
Temperatura del gas de secado	350 °C
Presión del nebulizador	40 psi
Temperatura de vaporizador	350 °C
Voltaje del fragmentador	250 V
Rango de m/z	15-10000000 Da

5.4.2.6. Pigmentos clorofílicos y carotenoides

La valoración global del contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides se ha realizado siguiendo el método propuesto por Mínguez y col. [292]. El método consiste en determinar la absorbancia de una disolución de aceite de oliva a la longitud de onda de máxima absorción del componente mayoritario de la fracción clorofílica y carotenoide, es decir, la feofitina y la luteína respectivamente.

El procedimiento consiste en disolver 7.5 g de aceite en ciclohexano, enrasando a 25 mL. Una vez homogeneizada la disolución se leen las absorbancias a 670 nm, para la determinación de los pigmentos clorofílicos, y a 472 nm para los pigmentos carotenoides.

La concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides, en mg de pigmento por Kg de aceite, se calcula a partir de la Ecuación 5.4.5:

$$C = \frac{\varepsilon \cdot V}{\varepsilon_0 \cdot P} \quad (\text{Ecuación 5.4.5.})$$

siendo,

C: Concentración de pigmento en la muestra en mg/Kg de aceite

ε : Absorbancia leída a 670 nm para los pigmentos clorofilicos y a 472 nm para los pigmentos carotenoides

ε_0 : Coeficiente de extinción específica del pigmento: ε_0 (feofitina a): 613

ε_0 (luteína): 2000

P: Peso de la muestra (g)

V: Volumen de la disolución de pigmentos (25 mL)

5.4.2.7. Determinación de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron analizados en un Cromatógrafo de gases (Varian CP-3800), equipado con control de flujo electrónico (EFC), un inyector capilar universal 1079 en el que se utiliza un liner fritado (Restek) y un automuestreador (Combipal autosampler, CTC Analytics). Se empleó la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (GC-MS).

Para el análisis HS-SPME-GCMS, alícuotas de 10 g de aceite recogidas a distintos tiempos de exposición, se introducían en un vial de 20 mL que contenía un imán recubierto de teflón para su agitación. El vial fue inmediatamente tapado con un sello magnético que contenía un septum de silicona/PTFE. Estos viales se situaron en el muestreador automático del equipo, donde el brazo robótico colocaba automáticamente el vial en el horno para su calentamiento a 80°C durante 50 min (con agitación a 700

r.p.m.). Este tiempo era suficiente para que se produjera una situación de equilibrio entre la muestra y la fase gas que quedaba en la parte superior del vial (espacio de cabeza). La absorción (SPME) se realizaba con una fibra de tipo polar (DVB/Caroxen/PDS - Supelco) [76]. Los analitos retenidos en la fibra se desorbían en el inyector del cromatógrafo durante 10 minutos a 250°C. La separación cromatográfica se realizó con una columna capilar polar SUPELCOWAX® 10 de sílice fundida (30m x 0,25 mm ID, 0,25 mm espesor de la película). Se utilizó como gas portador Helio a un flujo constante de 1.0 ml/min. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 40°C durante 5 min, posteriormente se aumenta la temperatura hasta los 200°C a una velocidad de 4 °C/min, obteniéndose un tiempo de análisis de 45 minutos. La inyección se realizó en modo splitless a una temperatura constante de 250°C durante 10 minutos. La temperatura de la línea de transferencia y fuente de iones fueron 280°C y 250°C respectivamente. Para el análisis de los iones se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Varian 300-MS) trabajando en modo *full-scan*, utilizando un rango de masas comprendidas entre 34 y 200 m/z. La fuente de iones de impacto electrónico utilizaba una energía de ionización constante de 70 eV. Por último, para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el software Varian MS Workstation (versión 6.9), que contenía la librería NIST para la identificación de los productos encontrados, por comparación de los espectros.

5.4.2.8. Análisis sensorial

Este método clasifica el aceite de oliva en una escala numérica, relacionada con la percepción de los estímulos de su flavor, según el juicio de un grupo de catadores

seleccionados constituidos en panel. La evaluación sensorial ha sido llevada a cabo por el Panel de Cata, del Centro Tecnológico del Olivar y Aceite de oliva (CITOLIVA), de acuerdo con los métodos de análisis oficiales de la UE ([28] y posteriores modificaciones).

En primer lugar el catador huele, cata la muestra y valora la intensidad de los atributos tanto positivos como negativos, sobre una escala de intervalo estructurada de 6 puntos (Intensidad de la percepción: 0 Ausencia total, 5 Extrema) reflejándose en la hoja de valoración de la calidad del aceite donde están incluidas algunas de las percepciones sensoriales más características que suelen encontrarse con mayor frecuencia en los aceites de oliva y que describen su flavor (atributos positivos: frutado, manzana, otras frutas maduras, verde, amargo, picante, dulce; atributos negativos: agrio, avinado, avinagrado, ácido, basto, metálico, moho, borras, atrojado, rancio). En el caso de que se perciban otros estímulos que no se correspondan con los calificativos enumerados deberán ser anotados como “otros” empleando el calificativo/s que lo describa/n con mayor propiedad.

En segundo lugar, se establece una escala de 9 puntos (1 Calidad pésima, 9 Excepcional) para dar una puntuación única, conjunta, de las características del aceite. Esta puntuación debe ser consecuente con las virtudes y defectos encontrados en el aceite.

Para determinar la puntuación global de la muestra el jefe del panel tabulará las puntuaciones de todo el grupo y calculará la media aritmética y el error típico de la media. De acuerdo con la valoración global obtenida, los aceites se clasifican en Extra 6.5, Virgen 5.5, Corriente 3.5, Lampante < 3.5. El perfil de la muestra se obtiene calculando los valores medios de las intensidades de los distintos atributos. Proporciona una información importante para distinguir rasgos característicos de los distintos aceites.

Si el valor de la intensidad media de amargor y/o picante es superior a 2.5, al aceite se le dará la clasificación correspondiente y se hará constar que es especialmente amargo y/o picante.

5.4.3. Resultados y discusión

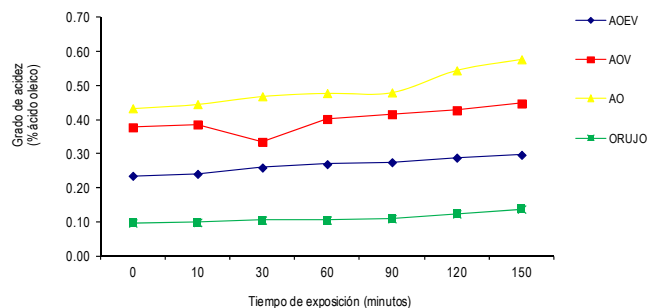
5.4.3.1. Evolución de los parámetros de calidad de aceites de oliva con el tratamiento ultravioleta

En la Figura 5.4.3(a) se observan los resultados obtenidos de la determinación del grado de acidez de las muestras de aceites estudiadas. La acidez ha oscilado entre 0.24 y 0.30% para el aceite de oliva extra virgen, de 0.38 a 0.44% para aceite de oliva virgen, de 0.43 a 0.58% para el aceite de oliva y de 0.10 a 0.14% para el aceite refinado de orujo. Estos aceites se encontraron dentro de la normativa COI [20], al finalizar el periodo de exposición ultravioleta, que establece un valor menor del 0.8% para aceite de oliva extra virgen, menor a 2.0% para aceite de oliva virgen, menor a 1.0% aceite de oliva y menor a 0.3% para aceite refinado. No obstante, la acidez de las muestras analizadas aumentó conforme avanzaba la exposición a la luz ultravioleta.

La Figura 5.4.3 (b) muestra los resultados obtenidos de la determinación del índice de peróxidos de las muestras de aceites estudiadas, los valores han oscilado entre 6.50 y 8.75 mEqO₂/Kg para el aceite de oliva extra virgen, de 9.25 a 12.50 mEqO₂/Kg para aceite de oliva virgen, de 2.50 a 6.00 mEqO₂/Kg para el aceite de oliva y de 4.00 a 9.00 mEqO₂/Kg para el aceite refinado de orujo. En todos los casos, los aceites se encontraron dentro de la normativa COI, que establece un valor menor de 20 mEqO₂/Kg para aceite de oliva extra virgen, aceite de oliva virgen, menor a 15 mEqO₂/Kg para el aceite de oliva y menor a 15 mEqO₂/Kg para aceite refinado. Los aceites estudiados muestran un progresivo aumento en el índice de peróxido, que indica procesos de oxidación. Todos los aceites siguieron un patrón similar, es decir aumentaron los valores del índice de peróxidos. Ninguno de los aceites superó el límite establecido por el COI [20] (≤ 20 mEq aceite de oxígeno/Kg) en ningún momento. Estos resultados son similares a los de Caponio y col, [293], aunque ese estudio fue de 12 meses en presencia de luz.

Todos los aceites mostraron un patrón similar, con K_{270} y K_{232} generalmente constante durante todo el período de exposición a la luz UV (Figura 5.4.4. (a) y (b)).

(a)



(b)

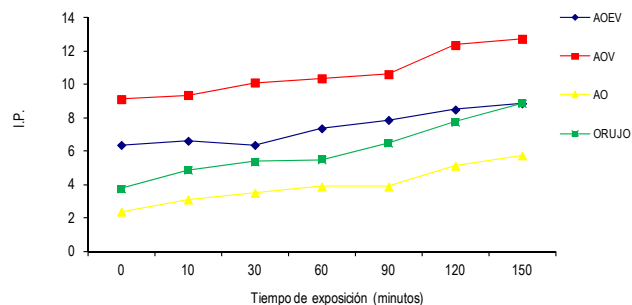
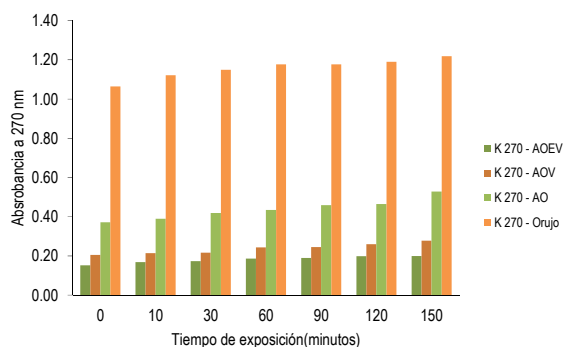


Figura 5.4.3. (a) Resultados del grado de acidez (%), (b) índice de peróxido (mEqO₂/Kg).

La Figura 5.4.4 (a) muestra los resultados obtenidos del K_{270} en las muestras de aceites estudiadas. Los valores obtenidos han oscilado entre 0.15 y 0.20 para el aceite de oliva extra virgen, entre 0.20 y 0.28 para aceite de oliva virgen, entre 0.37 y 0.52 para el aceite de oliva y entre 1.07 y 1.22 para el aceite refinado de orujo. En todos los casos, los aceites se encontraron dentro de la normativa COI [20], que establece un valor menor de 0.22 para aceite de oliva extra virgen, menor a 0.25 para aceite de oliva virgen, menor a 0.90 para el aceite de oliva y menor a 2.00 para aceite refinado. La

exposición a la luz UV tenía poco efecto sobre el K_{232} de aceite de oliva. Los aumentos del K_{270} y K_{232} son consistentes con los resultados obtenidos del índice de peróxidos con el inicio de procesos de oxidación.

(a)



(b)

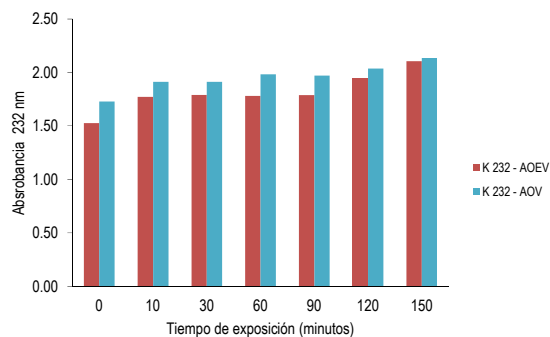


Figura 5.4.4. K_{270} (a) y K_{232} (b) de las muestras de aceite de oliva sometidas a la radiación UV. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los de Gutiérrez y col. [294], quien describió la luz como la causa principal del aumento de la absorbancia a 270 nm.

La Figura 5.4.4 (b) muestra los resultados obtenidos del K_{232} para las muestras de aceites estudiadas. Han oscilado entre 1.53 y 2.11 para el aceite de oliva extra virgen y

entre 1.73 y 2.14 para aceite de oliva virgen. Estos aceites se encontraron dentro de la normativa COI [20], que establece un valor menor de 2.50 para aceite de oliva extra virgen y 2.60 aceite de oliva virgen. Para las demás calidades de aceites no se mide este valor según la normativa.

Según los resultados obtenidos en los diferentes parámetros de calidad ensayados, los aceites pueden seguir manteniendo dentro de sus categorías después de ser sometidos a la luz UV por un periodo de 150 minutos, tal como se ha demostrado en los capítulos anteriores, permite la eliminación de residuos de plaguicidas con un porcentaje muy elevado para la mayoría de los compuestos estudiados. Como conclusión, en términos globales, los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los descritos por Martínez y col. [235]. En la Tabla 5.4.4., se resumen los resultados obtenidos junto con sus desviaciones estándar, según el tiempo de exposición a la luz ultravioleta.

Tabla 5.4.4. Características medias ($\pm$ desviación estándar) de la evolución de los criterios de calidad de los aceites estudiados según el tiempo de exposición ultravioleta.

<i>Categorías comerciales</i>	<i>Tiempo exposición UV</i>	<i>Grado de acidez % ácido oleico^{a)}</i>	<i>I.P. meq de O₂/Kg^{a)}</i>	<i>K₂₃₂^{a)}</i>	<i>K₂₇₀^{a)}</i>
AOEV	0	0.24 $\pm$ 0.01	6.38 $\pm$ 0.17	0.16 $\pm$ 0.01	1.77 $\pm$ 0.01
	10	0.24 $\pm$ 0.01	6.63 $\pm$ 0.17	0.19 $\pm$ 0.01	1.77 $\pm$ 0.01
	30	0.26 $\pm$ 0.01	6.38 $\pm$ 1.24	0.21 $\pm$ 0.01	1.79 $\pm$ 0.01
	60	0.27 $\pm$ 0.01	7.38 $\pm$ 0.18	0.19 $\pm$ 0.01	1.78 $\pm$ 0.01
	90	0.27 $\pm$ 0.01	7.88 $\pm$ 0.18	0.23 $\pm$ 0.01	1.93 $\pm$ 0.01
	120	0.29 $\pm$ 0.01	8.50 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	2.11 $\pm$ 0.01
	150	0.30 $\pm$ 0.01	8.88 $\pm$ 0.18	0.25 $\pm$ 0.01	2.10 $\pm$ 0.01
AOV	0	0.38 $\pm$ 0.01	9.13 $\pm$ 0.18	0.20 $\pm$ 0.01	1.73 $\pm$ 0.01
	10	0.39 $\pm$ 0.01	9.38 $\pm$ 0.18	0.21 $\pm$ 0.01	1.83 $\pm$ 0.01
	30	0.33 $\pm$ 0.09	10.13 $\pm$ 0.18	0.22 $\pm$ 0.01	1.91 $\pm$ 0.01
	60	0.40 $\pm$ 0.01	10.38 $\pm$ 0.18	0.24 $\pm$ 0.01	2.03 $\pm$ 0.01
	90	0.42 $\pm$ 0.01	10.63 $\pm$ 0.18	0.25 $\pm$ 0.01	2.02 $\pm$ 0.01
	120	0.43 $\pm$ 0.02	12.38 $\pm$ 0.18	0.26 $\pm$ 0.01	2.06 $\pm$ 0.01
	150	0.45 $\pm$ 0.01	12.75 $\pm$ 0.35	0.27 $\pm$ 0.01	2.03 $\pm$ 0.01
AO	0	0.43 $\pm$ 0.01	2.38 $\pm$ 0.18	0.38 $\pm$ 0.01	-
	10	0.45 $\pm$ 0.01	3.10 $\pm$ 0.35	0.40 $\pm$ 0.01	-
	30	0.47 $\pm$ 0.01	3.50 $\pm$ 0.35	0.40 $\pm$ 0.01	-
	60	0.48 $\pm$ 0.01	3.88 $\pm$ 0.18	0.39 $\pm$ 0.01	-
	90	0.48 $\pm$ 0.01	3.88 $\pm$ 0.18	0.39 $\pm$ 0.01	-
	120	0.54 $\pm$ 0.01	5.13 $\pm$ 0.18	0.41 $\pm$ 0.01	-
	150	0.58 $\pm$ 0.01	5.75 $\pm$ 0.35	0.43 $\pm$ 0.01	-
ORUJO	0	0.10 $\pm$ 0.01	3.75 $\pm$ 0.35	1.07 $\pm$ 0.01	-
	10	0.10 $\pm$ 0.01	4.88 $\pm$ 0.53	1.11 $\pm$ 0.01	-
	30	0.11 $\pm$ 0.01	5.38 $\pm$ 0.53	1.14 $\pm$ 0.01	-
	60	0.11 $\pm$ 0.01	5.50 $\pm$ 0.35	1.17 $\pm$ 0.01	-
	90	0.11 $\pm$ 0.01	6.50 $\pm$ 0.35	1.18 $\pm$ 0.01	-
	120	0.12 $\pm$ 0.01	7.75 $\pm$ 0.35	1.19 $\pm$ 0.01	-
	150	0.14 $\pm$ 0.01	8.88 $\pm$ 0.18	1.22 $\pm$ 0.01	-

^{a)} Medias $\pm$ desviación estándar (n=3)

5.4.3.2. Evolución del contenido de ácidos grasos frente al tratamiento con radiación ultravioleta

La composición de ácidos grasos encontrada en el inicio del experimento ($t = 0$) es la característica de un aceite de oliva virgen de variedad picual [295, 296]. En la Tabla 5.4.5, se muestra la variación en la composición de los ácidos grasos del aceite para los distintos tiempos de exposición a la luz ultravioleta. Como se puede apreciar, los porcentajes de cada uno de los ácidos grasos prácticamente no sufrieron cambios significativos durante la exposición a la luz UV. Parte de estas ligeras variaciones pueden atribuirse a la incertidumbre del método utilizado (con una desviación estándar del orden del 5 %) más que a cambios propiamente debidos al tratamiento. Por otro lado se han calculado el coeficiente de variación (C.V.%), para determinar la variabilidad de los resultados en la que se observa que los ácidos grasos esteárico y oleico su variabilidad es menor a 1, y para los UFA y MUFA, la variabilidad es también menor.

Se encontró, que los ácidos insaturados (UFA –Unsaturated Fatty Acids) disminuyen de 83.50% a 81.37%, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA - MonoUnsaturated Fatty Acid) de 78.86 a 77.26%. En los tiempos de exposición se observó la disminución de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA - Polyunsaturated fatty acids) de 4.64 a 4.11% (linoleico y linolénico). Los ácidos grasos insaturados son muy importantes para la estabilidad de aceites debido a las reacciones químicas que se producen en los dobles enlaces. Las diferentes reacciones de oxidación dependen del número de dobles enlaces en el carbono. Como era de esperar [293], tanto el ácido linolénico (del 4.2 al 3.7 %) como el linolénico (de 0.40 a 0.34 %) disminuyeron.

El contenido en ácidos grasos saturados (SFA - *saturated fatty acids*), aumenta de 15.79 a 17.10%. Comparando las relaciones de $\Sigma\text{UFA} / \Sigma\text{SFA}$ en el aceites de oliva se observa que hubo un descenso de 5.29 a 4.76% después de 150 minutos de exposición a la luz UV, estas relaciones variaron significativamente en el tiempo. La relación $\Sigma\text{UFA} / \Sigma\text{SFA}$ disminuyeron un 10.00%. En definitiva, la exposición a la luz tuvo poco efecto sobre el

contenido de ácidos grasos libres de los aceites de este estudio. Estos resultados tienden a confirmar los resultados anteriores con los índices de K_{232} y K_{270} .

Tabla 5.4.5. Composición de ácidos grasos (%) en los aceites de oliva sometidos a luz ultravioleta.

Ácidos grasos	Tiempo de exposición UV (minutos)							C.V.%
	0	10	20	30	60	120	150	
Palmitico (16:0)	11.81	11.84	11.90	11.91	12.22	12.44	12.96	3.48
Palmitoleico (16:1)	0.14	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.10	13.23
17:0	0.70	0.96	1.04	1.04	1.19	1.21	1.44	21.27
17:1	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	3.05
Estearico (18:0)	3.32	3.38	3.38	3.38	3.39	3.40	3.42	0.91
Oleico (18:1)	78.72	78.65	78.60	78.60	78.13	77.94	77.16	0.72
Linoleico (18:2)	4.24	3.88	3.87	3.79	3.79	3.78	3.77	4.33
Araquico (20:0)	0.66	0.69	0.70	0.70	0.70	0.70	0.72	2.44
Linolénico (18:3)	0.40	0.40	0.40	0.39	0.39	0.38	0.34	5.26
Σ UFA	83.50	83.04	82.98	82.89	82.41	82.19	81.37	0.84
Σ MUFA	78.86	78.76	78.71	78.70	78.23	78.04	77.26	0.73
Σ PUFA	4.64	4.28	4.27	4.19	4.18	4.15	4.11	4.19
Σ SFA	15.79	15.91	15.97	15.99	16.30	16.54	17.10	2.83
Σ UFA/SFA	5.29	5.22	5.19	5.18	5.05	4.97	4.76	3.58

5.4.3.3. Estudio del comportamiento compuestos fenólicos en el aceite de oliva sometidos a la exposición de la luz ultravioleta

El estudio del comportamiento de compuestos fenólicos se ha determinado mediante dos aproximaciones distintas: un método de contenido total de polifenoles y a través del perfilado individual de los compuestos fenólicos mediante LC-TOFMS.

A) Determinación de polifenoles totales

En este estudio se ha empleado el método de Folin-Ciocalteu por ser el método más común para polifenoles totales en aceite de oliva. Los aceites de oliva en estudio y sobre todo el aceite oliva virgen, contiene cantidades significativamente mayores de compuestos fenólicos que el aceite de oliva.

Tabla 5.4.6. Contenido en polifenoles totales de los dos tipos de aceite de oliva virgen estudiados y su evolución con el tiempo de exposición UV.

<i>Categorías Comerciales</i>	<i>Tiempo de exposición (min)</i>	<i>Polifenoles totales (mg/Kg ác. Gálico)^{a)}</i>	<i>% Degradación</i>
AOEV	0	441.28 $\pm$ 3.18	0.00
	10	442.67 $\pm$ 3.34	0.34
	60	433.99 $\pm$ 1.20	1.65
	120	399.62 $\pm$ 0.60	9.44
	150	388.16 $\pm$ 1.59	12.03
AOV	0	393.19 $\pm$ 2.10	0.00
	10	402.40 $\pm$ 1.80	2.34
	60	385.03 $\pm$ 3.18	2.07
	120	382.26 $\pm$ 0.60	2.78
	150	367.67 $\pm$ 6.01	6.49

a) Medias $\pm$ Desviación estándar (n=3)

Los niveles de polifenoles totales obtenidos están recogidos junto con la desviación estándar en la Tabla 5.4.6. y Figura 5.4.5. expresados en mg/Kg de ácido gálico. En nuestro estudio podemos observar que la luz ultravioleta afecta a la cantidad de polifenoles totales y por consiguiente a la estabilidad de los aceites. En estudios anteriores se ha establecido una relación lineal entre el contenido en polifenoles y la estabilidad de los aceites [297, 298], de forma que variedades como la Arbequina presentan una estabilidad baja debido al contenido menor de polifenoles. Los polifenoles totales presentes en los aceites analizados han presentado un descenso comprendido entre el 6.49 % y el 12.03% dependiendo de cada tipo de aceite. Hay que considerar que al producirse una degradación de polifenoles complejos de mayor peso molecular en otros más sencillos hacen que el contenido total de polifenoles no disminuya tanto.

Por ejemplo, la hidrólisis de la oleuropeína [288] da lugar a una molécula de ácido elenólico y a otra de hidroxitirosol. Considerando que los polifenoles complejos como la oleuropeína son lo que se encuentran en mayor proporción en el aceite de oliva virgen extra, la reducción del contenido total no se ha visto tan afectada por la radiación UV. Con la finalidad de estudiar de forma más detallada la degradación de los polifenoles, se llevó a cabo un estudio de cada uno de los compuestos de forma individualizada, cuyos resultados se discuten a continuación.

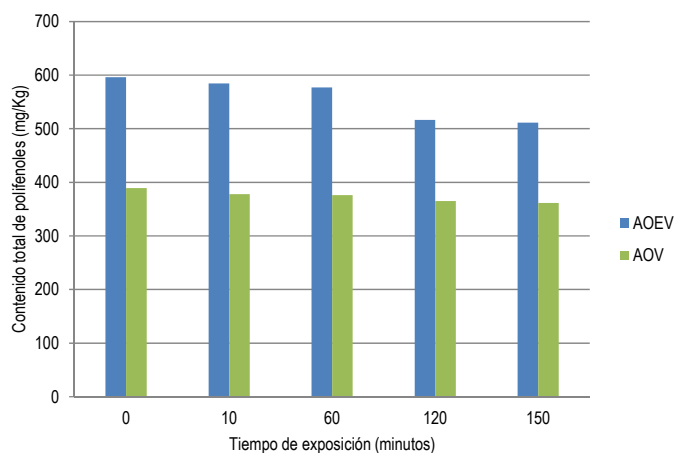


Figura 5.4.5. Contenido total de polifenoles (mg/Kg) de las muestras sometidas a la exposición ultravioleta (AOEV: aceite de oliva virgen extra, AOV: aceite de oliva virgen).

B) Perfilado de polifenoles en aceite de oliva virgen y su evolución con la radiación ultravioleta

Se realizó la evaluación de la degradación de los polifenoles de forma individual, a través de las áreas de pico de cada uno de los compuestos, puesto que para algunos de los compuestos no se dispone de patrones comerciales. Se sometieron las muestras de aceite de oliva a la radiación ultravioleta extrayendo alícuotas a diferentes intervalos de

tiempo para su posterior análisis. En la Tabla 5.4.7., se muestran los polifenoles identificados en el aceite de oliva virgen mediante la identificación con patrones.

Tabla 5.4.7. Identificación de los polifenoles mediante LC-TOFMS en aceite de oliva virgen: t_R , composición elemental y m/z .

	Polifenoles	t_R (min)	Ión	Composición elemental	$[M-H]^-$ m/z teórica	$[M-H]^-$ m/z experimental	Error (ppm)
1	Ácido cafeico	9.301	$[M-H]^-$	$C_9H_8O_4$	179.0363	179.0348	0.73
2	Ácido gálico	5.00	$[M-H]^-$	$C_7H_6O_5$	169.0142	169.0142	0.42
3	Ácido giberólico	12.33	$[M-H]^-$	$C_{19}H_{22}O_6$	345.1303	345.1301	0.58
4	Ácido ferúlico	12.88	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	193.0520	193.0522	1.21
5	Ácido p-cumárico	11.46	$[M-H]^-$	$C_9H_8O_3$	163.0401	163.0398	1.19
6	Ácido siríngico	10.11	$[M-H]^-$	$C_9H_{10}O_5$	197.0455	197.0456	0.43
7	Ácido vanílico	11.38	$[M-H]^-$	$C_8H_8O_4$	167.0350	167.0348	0.89
8	Apigenina	15.21	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{10}O_5$	269.0455	169.0455	0.80
9	Hidroxitirosol	5.35	$[M-H]^-$	$C_8H_{10}O_3$	153.0557	153.0558	0.29
10	Luteolina	14.04	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{10}O_6$	285.0405	285.0405	0.54
12	Resveratrol	14.38	$[M-H]^-$	$C_{14}H_{12}O_3$	227.0714	227.0714	1.13
13	Tirosol	8.63	$[M-H]^-$	$C_8H_{10}O_2$	137.0608	137.0607	0.96
14	Ácido elenólico	13.08	$[M-H]^-$	$C_{11}H_{14}O_6$	241.0718	241.0727	3.92

Los compuestos fenólicos mayoritarios en el aceite de oliva virgen son derivados secoiridoides (oleuropeína aglicona y ligustrósido aglicona), y la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol o al tirosol [37, 38, 299, 300]. La existencia de una serie de derivados isómeros de estos secoiridoides han sido descritos recientemente en aceite de oliva virgen [48]. De hecho, se han encontrado isómeros identificados del ligustrósido aglicona (diez isómeros) y de aglicona oleuropeína (siete isómeros) en los aceites de oliva analizados de ambas campañas, mediante LC-TOFMS, tal como se muestra en la Figura 5.4.6.

En este trabajo llevado a cabo por investigadores de la Universidad de Granada [48], se identificaron siete picos de la oleuropeína aglicona y sus isómeros en diversas formas. Estos isómeros se pueden producir debido a la tautometría cetona-enólica y a procesos de

transformación de estos derivados durante la maduración, almacenamiento y procesamiento de los productos oleícolas.

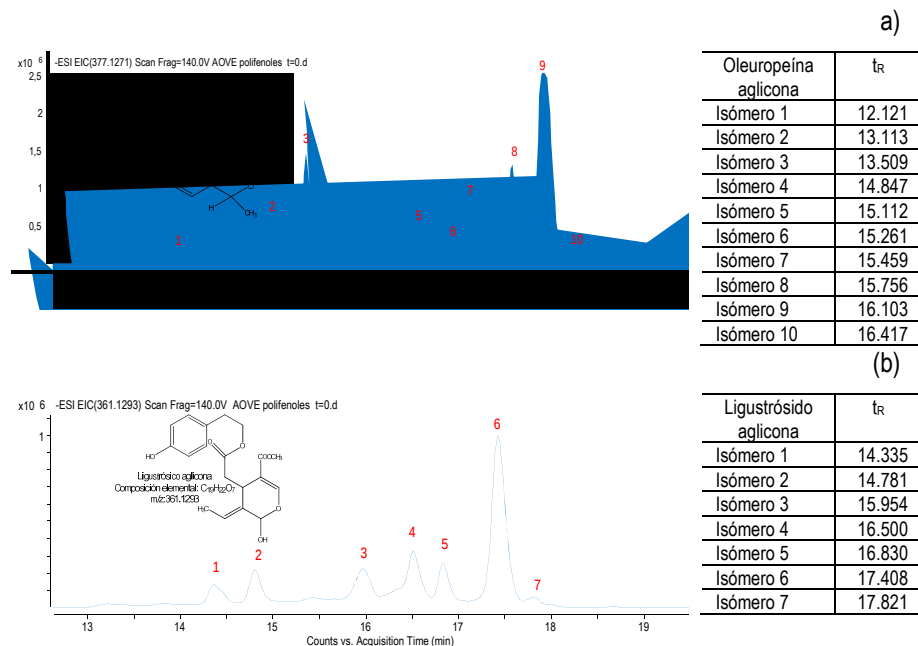


Figura 5.4.6. (a) Cromatograma de ión extraído de oleuropeína aglicona (m/z 377.1271), mostrando diez isómeros con sus diferentes t_R ; (b) Cromatograma de ión extraído de ligustrósido aglicona (m/z 361.1293), mostrando los siete isómeros con sus diferentes t_R . detectados en el presente trabajo.

Para el estudio del comportamiento y evaluación de los niveles de concentración de los polifenoles complejos como la oleuropeína y el ligustrósido, se consideró la suma de las áreas de todos los picos de los cromatogramas de ión extraídos por LC-TOFMS de cada uno de ellos. En la Figura 5.4.7.(a), se muestra la degradación de la oleuropeína aglicona y ligustrósido aglicona de 62.03 y 63.13% respectivamente, después de 150 minutos de exposición. En la Figura 5.4.7. (b) y (c) se observa el aumento del hidroxitirol, tirosol y ácido elenólico es de 18.33, 142.45 y 43.00% aproximadamente, ya que son productos de la degradación de la oleuropeína y su forma decarboximetilada,

estos compuestos son precursores del ácido elenólico y la forma de dialdehídica ácido elenólico decarboxymethyl, respectivamente [301], ocurriendo principalmente por la degradación/oxidación de la decarboximetil oleuropeína aglicona y oleuropeína aglicona.

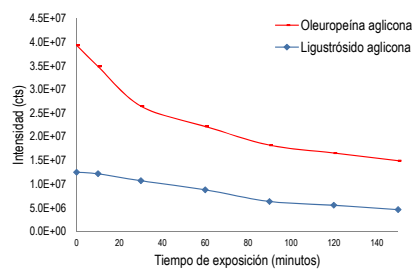
Las tendencias de los fenoles simples, secoiridoides y flavonas durante el almacenamiento están relacionadas con la estabilidad y la naturaleza de los aceites de oliva, estos compuestos pueden sufrir alteraciones debido principalmente a la hidrólisis y la oxidación durante el almacenamiento del aceite de oliva en la industria [302, 303], tal como se observa en la Figura 5.4.7.(d), el descenso de los flavonoides (luteolina y apigenina) que se degradaron 59.15 y 49.75% respectivamente.

Por otro lado los alcoholes fenólicos y derivados de ácido elenólico estaba vinculada a los cambios en agliconas secoiridoides. Estos fenoles complejos se caracterizan por la presencia de ácido elenólico o sus derivados vinculados a las estructuras alcohol fenólicos (hidroxitirosol y tirosol). La disminución de estos fenoles complejos y el aumento de la cantidad de restos libres alcohólicas ácidas y aromático puede ser explicado por la hidrólisis del éster unido entre la parte fenólica y el resto de la molécula [302].

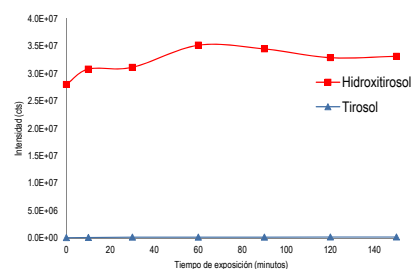
Los ácidos fenólicos identificados en el aceite de oliva tienen una tendencia a degradarse, tal como se muestra la Figura 5.4.7.(e), presentando porcentajes de 56.56% para el p-cumárico, 89.76% para el ácido cafeico y 97.35% para ácido siríngico, a los 150 minutos de exposición a la luz UV.

(a)

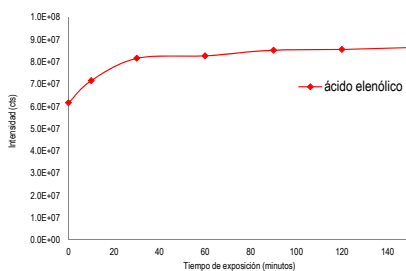
(b)



(c)



(d)



(e)

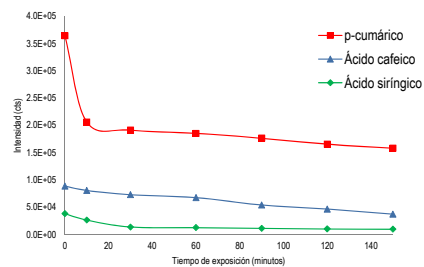
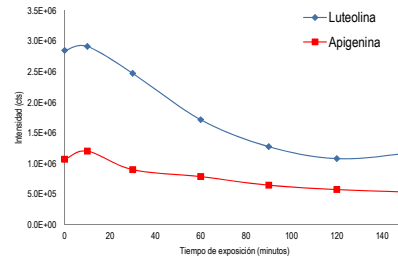


Figura 5.4.7. Evolución de los principales compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen durante el tiempo de exposición a la luz ultravioleta (a) secoiridoides y sus principales derivados; (b) Alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol); (c) ácido elenólico; (d) flavonoides; (e) ácidos fenólicos.

5.4.3.4. Estudio del comportamiento de los tocoferoles presentes en el aceite de oliva sometidos a la exposición de la luz ultravioleta

Con el fin de observar el comportamiento de los tocoferoles presentes en las muestras de aceite de oliva, se llevó a cabo la puesta a punto de un método LC-APCI-TOFMS, empleando como referencia el α -tocoferol. Se identificó el pico, los valores de tiempo de retención y composición elemental del ion seleccionado tal como muestra la Tabla 5.4.7.

Tabla 5.4.7. Parámetros analíticos para la identificación de α -tocoferol en aceite de oliva virgen analizadas por LC-APCI-TOFMS.

Compuesto	t_R (min)	Composición elemental	Ion seleccionado	m/z
α -tocoferol	6.914	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	[M+H] ⁺	430.3811

La Figura 5.4.8. incluye los cromatogramas de ion extraído de α -tocoferol superpuestos LC-APCI-TOFMS de las alícuotas de aceite de oliva virgen recogidas a $t=0$, 10, 20 y 150 minutos en la que se observa el descenso de los tocoferoles por la exposición a la luz ultravioleta. La exposición a luz UV tuvo un efecto significativo en el contenido de α -tocoferol del aceite en este estudio. El nivel de α -tocoferol del aceite de oliva virgen extra estudiado era 147.24 mg/Kg, valor que está de acuerdo con los recogidos en bibliografía para el aceite de oliva virgen que suele variar desde 50 hasta 200 mg/Kg [1]. En aceites de oliva vírgenes españoles, se han cuantificado niveles similares a los encontrados por nosotros, 86.6 mg/Kg [304], 55-234 mg/Kg [71].

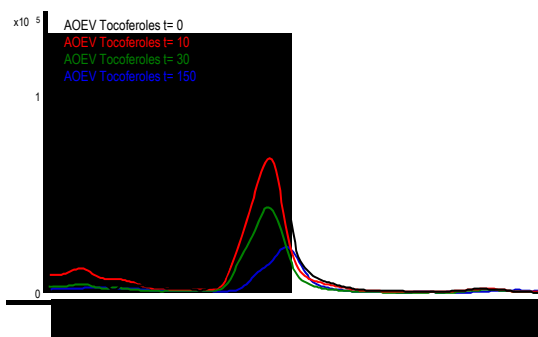


Figura 5.4.8. Cromatogramas de ion extraído superpuesto, obtenidos mediante el análisis por LC-APCI-TOFMS de las muestra de aceite de oliva extra virgen, a tiempo 0 hasta 150 minutos, en la que se identifican los picos del α -tocoferol.

En cuanto a la experimentación realizada con la exposición de la muestra a la luz ultravioleta, hemos podido comprobar que el contenido de tocoferoles disminuye, en un 79.90%, pero no llega a ser en su totalidad después de los 150 minutos, tal como podemos observar en la Figura 5.4.9. Como único precedente bibliográfico relacionado con este trabajo, en estudios realizados en el almacenamiento de aceite de oliva, el contenido de α -tocoferol disminuye un 20% después de 2 años [305]. En éstas investigaciones realizadas para evaluar el almacenamiento del aceite de oliva, sólo se obtuvieron unas pérdidas del 14 al 32% en el contenido de tocoferoles. Esta tendencia puede deberse a diferentes mecanismos antioxidantes de este compuesto [69]. Cuando se exponen a la luz, los tocoferoles actúan como donantes de electrones, frenando las reacciones de oxidación, y como receptores de electrones o la compactación de los oxígeno singlete, con la consiguiente inhibición de la fotooxidación de los lípidos [288]. Sin embargo, el oxígeno singlete formado en la reacción foto-oxidativa es 1,000-1,500 veces más reactivo que el oxígeno triplete de tomar parte en la reacción de auto-oxidación [297]. Esto significa que la fotooxidación se lleva a cabo más rápido que la auto-oxidación e implica una mayor disminución de tocoferoles en aceites expuestos a la luz.

De nuestra experiencia durante el análisis del contenido de tocoferoles en varios aceites de distintas campañas, encontramos sin embargo que sólo los más recientes de la última campaña conservaban un contenido razonablemente alto de tocoferoles (> 15-20 mg/Kg).

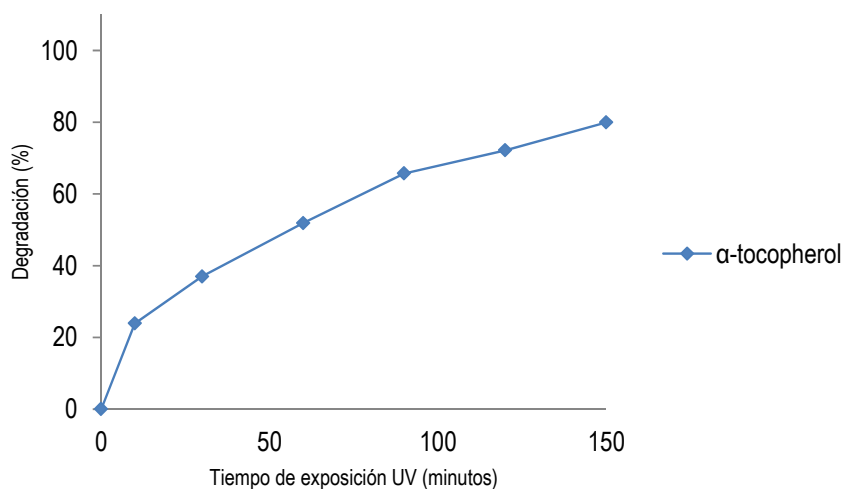


Figura 5.4.9. Degradación (%) de α -tocoferol de las muestras de aceite de oliva virgen extra sometidas a la exposición ultravioleta

5.4.3.5. Estudio de los pigmentos clorofílicos y carotenoides en los aceites de oliva

Los pigmentos clorofílicos y carotenoides son los responsables del color de los aceites de oliva, que se considera un parámetro de calidad. Como ya se ha indicado por varios autores [306, 307], el contenido de estos pigmentos está afectado por la etapa de maduración que conduce siempre a una disminución. Además actúan como antioxidantes, por lo que es importante observar el comportamiento frente a la luz ultravioleta [308]. Existen algunos estudios de la fotooxidación del aceite de oliva, para explicar el papel de la clorofila, que actúa como un fotosensibilizador, con una rápida oxidación del aceite y la pérdida de color [308].

El contenido de los pigmentos clorofilicos al final de la exposición de la luz ultravioleta, para todas las muestras de aceite, salvo para el aceite de orujo (exento de pigmento debido al proceso de refinado), presentan unos valores de degradación del 80.45% (AOVE), 60.39% (AOV) y 84.38% (AO). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.4.8 y Figura 5.4.10. Dichos resultados son similares a los resultados encontrados por otras investigaciones realizadas en estudios de foto-oxidación de aceites de oliva [309]. La concentración de clorofila disminuyó drásticamente debido a la luz UV, tal como se describen en otras investigaciones de aceites expuestos a la luz en el almacenamiento, llegando en algunos casos hasta desaparecer [293, 310], debido a su papel como fotosensibilizadores. También se ha demostrado que las altas concentraciones de las clorofilas ofrecen resistencia a la oxidación de los aceites de oliva expuestos a la luz [311]. Esto puede explicarse por el efecto fotosensibilizante ejercido por las clorofilas en el aceite. La foto-oxidación del aceite en presencia de clorofilas conduce a la formación del oxígeno en su estado singlete es inestable y muy reactivo que tiende a reaccionar con los ácidos grasos insaturados dando lugar a la formación de hidroperóxidos. Además, la descomposición de hidroperóxidos, desencadena la reacción de radicales aumentando la oxidación [308, 312].

El contenido de pigmentos clorofilicos y carotenoides se ve modificada al avanzar el tiempo de exposición ultravioleta, como se muestra en la Figura 5.4.10, en la que la concentración de clorofilas va disminuyendo gradualmente causando la variación del color del aceite de verde a amarillo aumentando el contenido de carotenoides en los aceites estudiados, salvo el caso del aceite de orujo en el que el contenido de clorofilas no es detectado por el equipo y si la presencia de carotenoides que se van degradando conforme pasa el tiempo de exposición.

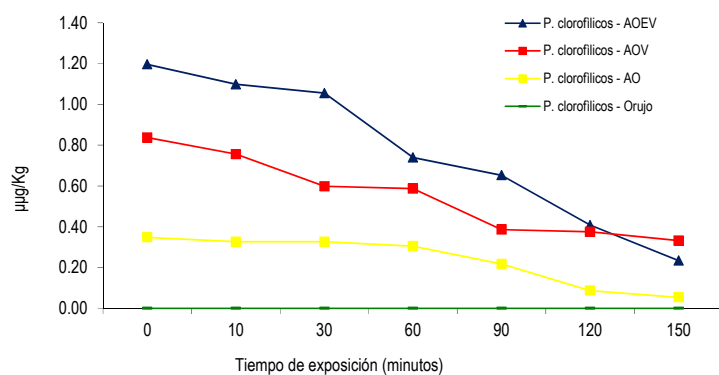
Tabla 5.4.8. Características medias ($\pm$ desviación estándar) del contenido de los pigmentos de las categorías comerciales en estudio los según el tiempo de exposición UV.

<i>Categorías comerciales</i>	<i>Tiempo de exposición UV</i>	<i>Pigmentos clorofilicos (mg/Kg)^{a)}</i>	<i>Pigmentos carotenoides (mg/Kg)^{a)}</i>
AOEV	0	1.21 $\pm$ 0.01	25.11 $\pm$ 0.24
	10	1.12 $\pm$ 0.03	26.07 $\pm$ 0.50
	30	0.97 $\pm$ 0.02	29.37 $\pm$ 0.44
	60	0.75 $\pm$ 0.05	42.63 $\pm$ 0.84
	90	0.57 $\pm$ 0.02	60.38 $\pm$ 0.48
	120	0.39 $\pm$ 0.03	86.03 $\pm$ 0.50
	150	0.29 $\pm$ 0.01	102.96 $\pm$ 0.45
AOV	0	0.82 $\pm$ 0.02	29.80 $\pm$ 0.93
	10	0.77 $\pm$ 0.02	32.74 $\pm$ 0.24
	30	0.62 $\pm$ 0.03	41.08 $\pm$ 0.53
	60	0.62 $\pm$ 0.05	41.16 $\pm$ 0.30
	90	0.39 $\pm$ 0.01	65.56 $\pm$ 0.90
	120	0.38 $\pm$ 0.01	68.84 $\pm$ 1.02
	150	0.34 $\pm$ 0.01	81.52 $\pm$ 1.22
AO	0	0.35 $\pm$ 0.01	7.14 $\pm$ 0.43
	10	0.33 $\pm$ 0.01	11.17 $\pm$ 0.77
	30	0.32 $\pm$ 0.01	17.53 $\pm$ 1.81
	60	0.30 $\pm$ 0.01	21.15 $\pm$ 0.24
	90	0.22 $\pm$ 0.01	29.43 $\pm$ 0.08
	120	0.09 $\pm$ 0.01	76.62 $\pm$ 1.19
	150	0.05 $\pm$ 0.01	126.34 $\pm$ 5.43
ORUJO	0	n.d	47.40 $\pm$ 0.14
	10	n.d	43.31 $\pm$ 1.45
	30	n.d	35.12 $\pm$ 4.53
	60	n.d	31.91 $\pm$ 0.11
	90	n.d	31.69 $\pm$ 0.11
	120	n.d	29.83 $\pm$ 0.30
	150	n.d	27.65 $\pm$ 0.62

^{a)} Medias $\pm$ Desviación estándar (n=3)

n.d.: no detectado

a)



b)

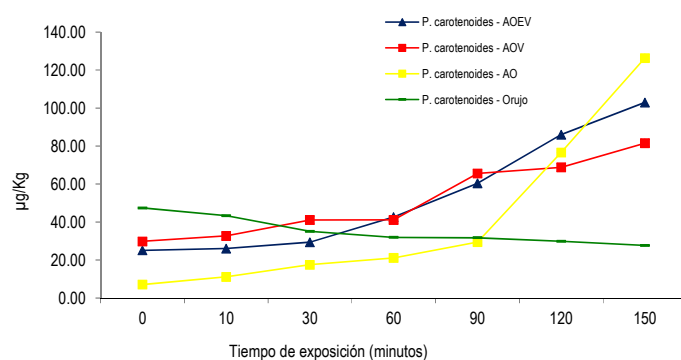


Figura 5.4.10. Degradación y evolución en el contenido de los pigmentos clorofilícos y carotenoides de las muestras de aceite expuestas a la luz ultravioleta (tiempo de exposición: 150 minutos) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$: (a) pigmentos clorofilícos; (b) pigmentos carotenoides.

La disminución de los pigmentos fue claramente confirmada por el análisis sensorial realizada a las muestras, ya que al inicio de la exposición a la luz ultravioleta mostraron un color verde intenso y un color amarillo oro en el final, tanto para el caso del aceite de oliva extra virgen como para las otras categorías comerciales.

5.4.3.6. Estudio del comportamiento de los compuestos volátiles en el aceite de oliva sometidos a la exposición de la luz ultravioleta

Este estudio se llevó a cabo mediante GC-MS, con el fin de identificar y observar el comportamiento de los compuestos volátiles en el aceite de oliva. Para cada compuesto al menos se observaron tres iones de clasificación que se eligieron sobre la base de su abundancia y la selectividad. Los parámetros empleados para la identificación de los principales compuestos volátiles estudiados (incluyendo los iones para la detección y los tiempos de retención) se muestran en la Tabla 5.4.9.

La Figura 5.4.11. se muestran los cromatogramas extraídos de iones totales mediante GC-HS-SPME de los aceites sometidos a la luz ultravioleta $t=0$ y $t=150$ minutos, en la que se observa el descenso de algunos de los compuestos volátiles y el desarrollo de otros como el hexanal, octanal, nonanal.

Estudios previos [313, 314] ha descrito que la oxidación del aceite de oliva da lugar a diversos compuestos y que es difícil asociar que especies son los responsables del sabor indeseable. La aplicación del método empleado basado en la técnica HS-SPME-GC-MS muestra la presencia de algunos aldehídos como pentanal, octanal y nonanal. La presencia de aldehídos ramificados tales como 2-metilbutanal, y alcoholes ramificados como 1-penten-3-ol, también es frecuente en aceites rancios [315, 316]. En la Figura 5.4.12. a) podemos apreciar que la mayor cantidad de los aldehídos encontrados es del hexanal, se encuentra en el aceite de oliva extra virgen, ya que este compuesto confiere a los aceites una nota aromática de verde-dulce, manzana verde, hierba, frutado, [86, 88], es por ello, que el contenido en el aceite de oliva virgen extra es mayor.

Tabla 5.4.9. Principales compuestos volátiles identificados en las muestras analizadas por GC-MS de los aceites sometidos a la exposición de la luz ultravioleta.

<i>Pico</i>	<i>Compuesto</i>	<i>t_R</i> (min)	<i>Composición elemental</i>	<i>MW</i>	<i>Iones producto (m/z)</i>
1	Octane	2.417	C ₈ H ₁₈	114	85-71-57
2	Etil acetato	3.374	C ₄ H ₈ O ₂	88	43
3	Pentanal	3.756	C ₅ H ₁₀ O	86	58-57-44
4	1-methoxy hexane	4.373	C ₇ H ₁₆ O	116	84-56
5	2-metilbutanal	5.222	C ₅ H ₁₀ O	86	58-57-41
6	3-etil-1,5-octadiene	6.509	C ₁₀ H ₁₈	138	109-69-41
7	Tolueno	7.003	C ₇ H ₈	92	91
8	Hexanal	8.447	C ₆ H ₁₂ O	100	29-57
9	(E)-2-pentanal	10.367	C ₅ H ₈ O	84	83-55-41
10	1-penten-3-ol	11.653	C ₅ H ₁₀ O	86	29-57
11	Heptanal	12.384	C ₇ H ₁₄ O	114	70-55-44
12	(Z)-3-hexenal	13.094	C ₆ H ₁₀ O	98	69-55-41
13	(E)-2-hexenal	13.167	C ₆ H ₁₀ O	98	55-69-83-98
14	2-metilbutanol	13.37	C ₅ H ₁₂ O	88	70-57-56
15	Ocimene	14.811	C ₁₀ H ₁₆	136	93-91-79
16	1-pentanol	14.983	C ₅ H ₁₂ O	88	70-55-42
17	Octanal	16.238	C ₈ H ₁₆ O ₂	128	84-69-56
18	(E)-2-heptenal	16.688	C ₇ H ₁₂ O	112	
19	(Z)-3-hexenol acetato	17.301	C ₈ H ₁₄ O ₂	142	82-67-43
20	(Z)-2-pentenol	17.539	C ₅ H ₁₀ O	86	57-68
21	hexanol	18.608	C ₆ H ₁₄ O	102	56-69-84
22	(Z)-3-hexenol	19.006	C ₆ H ₁₂ O	100	55-67-82
23	Nonanal	19.918	C ₉ H ₁₈ O	142	85-71-57
24	2,4-hexadienal	20.217	C ₆ H ₈ O	96	96-81-67
25	(E)-2-hexenol	20.457	C ₆ H ₁₂ O	100	57-67-82
26	(E)-2-octenal	21.135	C ₈ H ₁₄ O	126	83-70-55
27	2,4-Heptadienal	22.381	C ₇ H ₁₀ O	110	81
28	Alpha-copaene	22.86	C ₁₅ H ₂₄	204	161-119-105
29	Octanol	25.267	C ₈ H ₁₈ O	130	84-70-56

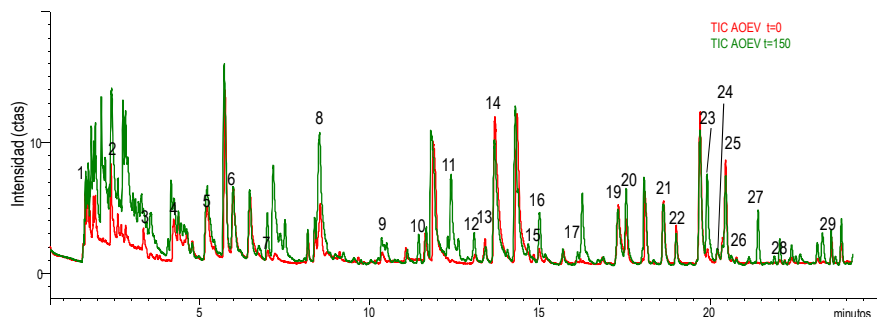


Figura 5.4.11. Cromatogramas de iones totales superpuestos, obtenidos mediante el análisis por GC-HS-SPME en modo *full scan* de la muestra de aceite de oliva extra virgen, a tiempo 0 y 150 minutos, en la que se identifican los picos mostrados en la Tabla 5.4.9.

Uno de los compuestos también identificados en el aceite de oliva es el octano, que presenta un aumento significativo de 244.83%. Según investigaciones realizadas por Barrio Pérez-Cerezal y col. [317], que utiliza la evaluación sensorial y el análisis de cromatografía de gases, para el estudio de la relación entre la concentración de octano y la calidad del sabor de aceite de oliva. En este estudio, se encontró una relación inversa. A medida que el área del pico de octano en el espacio de cabeza aumentó, la calidad sensorial disminuyó durante el almacenamiento del aceite de oliva durante 100 días. Para Morales y col. [86], el octano es uno de los compuestos que también se debe a una reacción de auto-oxidación, son los responsables de sabores desagradables en el aceite de oliva. Una alta concentración de octano se detecta en aceites rancios, y por lo general este hidrocarburo se asigna a los productos secundarios de autooxidación [318].

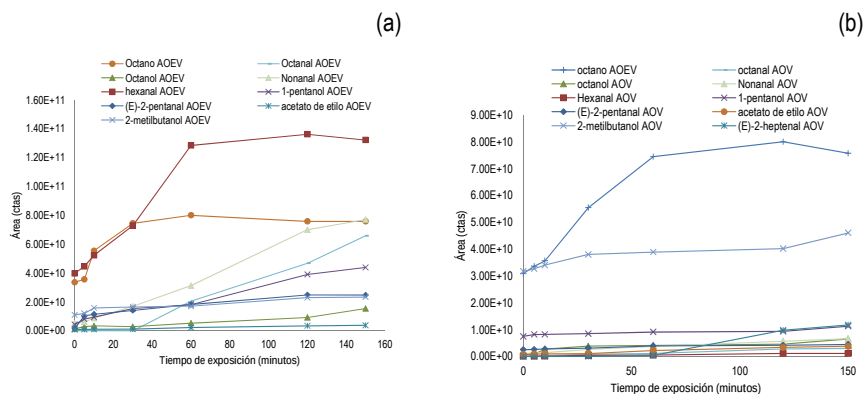


Figura 5.4.12. Contenido de algunos aldehídos presentes en las muestras de aceite de oliva (a) extra virgen y (b) virgen.

Se han identificado en los aceites de oliva cantidades de acetato de etilo, que van incrementando según va pasando el tiempo de exposición. Di Giovacchino y col [319] han descrito que elevadas concentraciones de acetato de etilo se encuentran en los aceites de oliva de baja calidad, dando defectos sensoriales "rancios".

En el aceite estudiado se ha observado también la presencia del (E)-2-heptenal (Figura 5.4.12. (b)), que es responsables principalmente de sabores desagradables en los aceites estudiado a partir de tiempos de mayores a los 60 minutos de exposición [77, 316].

En cuanto a los compuestos que le atribuyen buenas características al aceite como el (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenol, (Z)-3-hexenol, (Z)-2-pentenol, se encuentran en mayor cantidad en el aceite de oliva extra virgen, tal como lo muestra la Figura 5.4.13. (a) y en menor cantidad en el aceite de oliva virgen b); en ambas figuras se observa que éstos compuestos decrecen en función al tiempo de exposición, tal como se observaron en estudios realizados sobre el almacenamiento de aceite de oliva virgen [320].

El (E)-2-hexenal proviene de la transformación enzimática de los ácidos grasos [83] y contribuyen una de las principales notas aromáticas "césped", "banano" y "almendra" [86, 321], y también de la nota típica "verde", "manzana" y "afrutado" [86, 322]. Este compuesto se puede utilizar como marcador de calidad del aceite de oliva y está inversamente relacionado con el grado de oxidación del aceite de oliva virgen [76].

Se identificó también 1-hexanol, que contribuye a las notas sensoriales de "fruta", "hierba" y "suave" [323], y que fue más abundante en los aceites analizados. En lo que se refiere al contenido de alcoholes, el (E)-2-hexenal y (Z)-3-hexenal, estos compuestos se ha correlacionado con la percepción sensorial "verde" [324] y responsable de la "hierba cortada", olor que podría tener un papel en la mejora de la amargura [325], que en nuestra experimentación representan pérdidas una disminución de este compuesto.

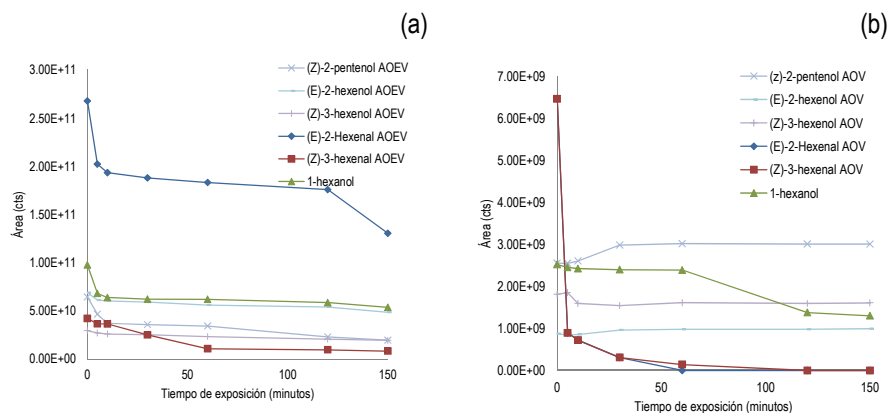


Figura 5.4.13. Contenido de alcoholes presentes en las muestras de aceite de oliva (a) extra virgen y (b) virgen.

5.4.3.7. Prueba del análisis sensorial de las muestras de aceite de oliva virgen sometidas a la exposición de la luz ultravioleta

Se evaluaron los efectos de la radiación UV sobre las características sensoriales del aceite de oliva virgen extra. Las muestras fueron sometidas al análisis sensorial, siendo estudiado el perfil característico del aceite de oliva de acuerdo con atributos sensoriales percibidos y evaluados por los paneles de cata [82]. Sin embargo, no todos los compuestos de la fracción volátil influyen en la calidad sensorial, por su concentración y umbral del olor, que juegan un papel importante. Por último hay que mencionar que los principales contribuyentes del aroma pueden contribuir a generar sinergismo [82].

La Tabla 5.4.10 muestra los principales descriptores de los aceites de oliva y se presentan las intensidades medias de los aceites estudiados y sus desviaciones estándar, respecto a sus atributos negativos y positivos, observándose cómo varían en función del tiempo de exposición a la luz ultravioleta.

Los aceites de oliva estudiados presentaron grandes diferencias en el perfil según los tiempos de exposición a la luz UV. El aroma del AOVE presentó mayor puntuación con el afrutado y picante causado por el (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal y (Z)-3-hexenol. Además, otros aromas que están relacionados con un mal sabor también se encontraron en menores cantidades.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se aprecia que el atributo afrutado, que corresponde al sabor y aroma de aceitunas frescas, encontrado en el $t=0$ con una puntuación de 1.70 puntos de intensidad es muy baja para aceites de oliva extra virgen, ya que los aceites españoles presentan mayor cantidad [67]. Los atributos positivos (afrutado, amargor y picante) han disminuido en los aceites expuestos a la luz UV.

Tabla 5.4.10. Tabla de intensidades organolépticas, de los tratamientos hasta los 150 minutos de exposición ultravioleta del aceite de oliva virgen (Método panel, [27]).

	<i>Tiempo de exposición UV (minutos)</i>						
	0	5	10	30	60	120	150
Atributos positivos							
A.	1.70 ±0.37	0.00 ±0.00	1.50 ±0.40	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
Am.	0.0 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
P.	1.10 ±0.60	1.50 ±0.34	1.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
Atributos negativos							
S.F.	2.50 ±0.50	3.00 ±0.49	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
M.H.	0.00 ±0.00	2.40 ±0.37	1.00 ±0.35	1.90 ±0.28	3.00 ±1.17	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
A.A.	1.90 ±0.36	1.40 ±0.54	1.20 ±0.52	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
M. Hum.	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.60 ±0.89	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
R	1.70 ±0.63	2.30 ±0.64	1.50 ±0.56	3.60 ±0.67	5.50 ±0.70	6.00 ±0.45	6.30 ±0.25
Otros	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00

A.: afrutado, Am.: amargo, P.: picante, S.F.: sedimento fangoso, M.H.: mohoso - húmedo, A.A.: avinado – avinagrado, M. Hum.: madera húmeda y R.: rancio.

La exposición a luz UV tuvo un efecto significativo sobre las características organolépticas de los aceites, afectando el grado de aceptabilidad por parte de los catadores, produciéndose un aumento de la puntuación organoléptica del rancio, la rancidez según el panel de cata, se observó antes en el período de exposición a la luz UV, dicho descriptor es también percibido en otras investigaciones usando luz UV en el almacenamiento [326], resultados similares se obtuvieron al almacenar el aceite de oliva durante 36 meses a exposición de la luz [327, 328], lo cual puede observarse en la Figura 5.4.11. Estos resultados se deben principalmente a los productos de oxidación secundarios que están presentes en las muestras expuesto a la luz UV, que imparten sabores y aromas desagradables.

Sin embargo éstos aceites presentaron en cuanto a la puntuación organoléptica defectos como mohoso, avinado-avinagrado, sedimento fangoso y rancio, los cuales fueron

percibidos por el panel de cata adjudicando valores altos (2.5), otros defectos como húmedo y metálico no fueron percibidos por el panel de cata, en ninguna de las muestras evaluadas.

La Figura 5.4.14. muestra las diferencias de los atributos en función de su intensidad, en los tratamientos evaluados y destaca la presencia del defecto a rancio mayor a $t=60$ para ambos aceites comerciales.

Si bien los tratamientos cumplen con las exigencias químico-analíticas de calidad establecidas por los parámetros de acidez, peróxido y absorbancia, el panel de cata pudo constatar la presencia de defectos en los aceites. Esta apreciación por parte de los panelistas se debió en gran medida a que los resultados de los valores químicos de los aceites han presentado ligero ascenso. Por lo señalado, los aceites se definen como lampantes, por la intensidad del rancio debido principalmente al tratamiento con la luz ultravioleta, que genera procesos de autooxidación como producto de descomposición de los triglicéridos, generando aquellos defectos desagradables e irreversibles, afectando directamente la calidad del aceite.

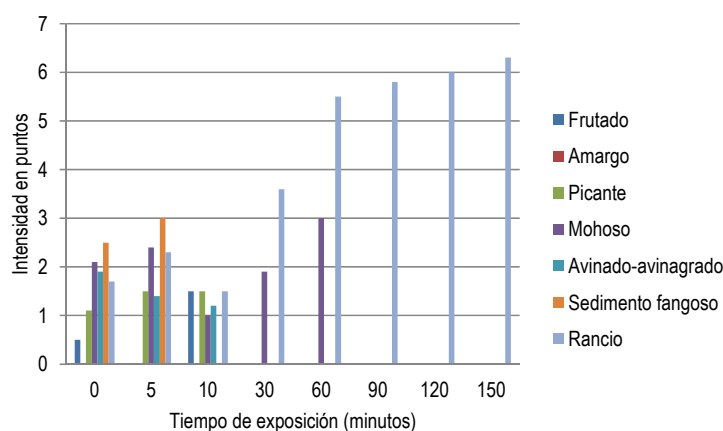


Figura 5.4.14. Intensidad de los atributos positivos y defectos del aceite de oliva virgen extra.

5.4.4. Conclusiones

En este estudio, se ha examinado en detalle el efecto del tratamiento con radiación UV sobre la composición del aceite de oliva de diferentes categorías comerciales, basado en el estudio de la evolución de los principales parámetros de calidad (acidez, índice de peróxidos, y K_{232} y K_{270}) y otros indicadores como el perfil de los ácidos grasos, el contenido individual y total de polifenoles, el contenido de tocoferoles, de pigmentos (clorofilas y carotenos), el contenido en compuestos volátiles y una prueba de análisis sensorial mediante panel de cata.

- En relación a los parámetros de calidad comercial indican que todos los aceites sometidos a la luz ultravioleta cumplen con la normativa exigida por el COI y el Reglamento Europeo para ser considerados aceites de oliva.
- La exposición a la luz ultravioleta no ha afectado al perfil de ácidos grasos, ni al contenido de polifenoles totales, pero en cuanto al estudio cualitativo mediante LC-TOFMS se observó un descenso significativo de los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol y tirosol, y un incremento significativo del ácido elenólico en el aceite.
- El contenido del α -tocoferol del aceite de oliva sometido a la luz ultravioleta ha presentado una tendencia a disminuir conforme se expone a la luz, sin embargo, el rango en que oscilan los valores de éste parámetro en el global de los aceites es demasiado amplio para resultar de relevancia en el plano biológico o nutricional.
- Tras los 150 minutos de exposición a la luz ultravioleta, los aceites muestran una menor concentración de pigmentos clorofílicos y un aumento de los pigmentos carotenoides.
- Los compuestos volátiles del aceite se han visto afectados por la exposición a la luz ultravioleta, disminuyendo los C6 y aumentando de forma significativa los alcoholes y acetatos, presentando valores elevados (a los 150 minutos), resultados

corroborados por la evaluación sensorial, resultando aceites lampantes por el incremento de la intensidad del rancio, pero a tiempos de exposición inferiores (60 minutos) se confunde este atributo con los propios del aceite de oliva.

A partir de los resultados obtenidos y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite de oliva podemos decir que la exposición de la luz ultravioleta (150 minutos) no afecta significativamente los parámetros clásicos de calidad del aceite de oliva ni a la composición de éste, salvo en el caso de los componentes volátiles y los tocoferoles. Esto refleja en la aparición de defectos en el análisis sensorial que hacen que la categoría comercial (aceite de oliva virgen extra) no perdure después del tratamiento con radiación UV completo. Por tanto, la tecnología desarrollada se puede considerar muy efectiva para el propósito de eliminar plaguicidas, pero enfocada como una etapa de refinado para la obtención de aceites de oliva refinados comerciales.

6. CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

El estudio de niveles de residuos plaguicidas en aceites de oliva virgen, en el que se analizaron 56 muestras procedentes de 10 países mostró la presencia de residuos de plaguicidas en el 71 % de las muestras. Los plaguicidas que se detectaron con mayor frecuencia en el aceite de oliva virgen fueron: buprofezin (46.43%), pirimiphos methyl (12.50%) y chlorpyrifos ethyl (5.36%). En 6 de las muestras analizadas se sobrepasaban los límites máximos de residuos establecidos (chlorpyrifos ethyl en 3 muestras de Chile y terbutylazine en 3 muestras de España).

Considerando los resultados obtenidos en las muestras estudiadas y las normativas existentes, se seleccionaron 49 plaguicidas para estudiar su comportamiento y degradación frente al tratamiento con radiación UV, tanto en aceite como en disolución acuosa. La tasa de degradación promedio obtenida para todos los plaguicidas ensayados en aceite de oliva virgen fue de aproximadamente el 75 % después de 150 minutos de tratamiento. Estos resultados muestran que la aplicación de tratamiento con luz ultravioleta, representa una alternativa efectiva para la degradación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva virgen ya que la mayoría se degradaron mayoritariamente a excepción de las triazinas y algunos compuestos organoclorados que debido a su elevada estabilidad, mostraron mayor resistencia.

Por último, en esta Tesis Doctoral también se ha examinado el efecto del tratamiento UV sobre la composición del aceite de oliva de diferentes categorías comerciales, a través de la evolución de los principales parámetros de calidad (acidez, índice de peróxidos, y K_{232} y K_{270}) y otros indicadores como el perfil de los ácidos grasos, el contenido individual y total de polifenoles, el contenido de tocoferoles, de pigmentos (clorofilas y carotenos), el contenido en compuestos volátiles y una prueba de análisis sensorial mediante panel de cata. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con UV (150 minutos) no afecta significativamente los parámetros clásicos de calidad del aceite de oliva ni a la composición de éste, salvo en el caso de los componentes volátiles y los tocoferoles. Esto último repercute en los análisis sensoriales, que

reflejaron la aparición de defectos que hacen que la categoría comercial (aceite de oliva virgen extra) no perdure después de un tratamiento con radiación UV completo (150 minutos).

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite, podemos decir que los aceites expuestos a la luz ultravioleta para un tiempo superior a 60 minutos, se ven perjudicados en cuanto a la evaluación sensorial. Por lo tanto, se puede concluir que los aceites de oliva virgen, expuestos a la luz ultravioleta, para tiempos inferiores a 60 minutos se mantienen estables, tanto los parámetros de calidad como sus características organolépticas. Esta tecnología puede también ser enfocada como una etapa de refinado para la obtención de aceites de oliva (refinados) comerciales. La presente metodología podría ser ensayada en otros aceites vegetales comestibles más empleados que el aceite de oliva

7. *B*IBLIOGRAFIA



6. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Mataix, J. Verdú, V.E. Martínez. Bases para el futuro, El Aceite de Oliva. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. (1988)
- [2] D. Barranco, Fernández-Escobar, L. Rallo. El cultivo del olivo. Coedición de la Consejería de agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y Mundi-Prensa. (1997)
- [3] M. Loukas, C.B. Krimbas. History of olive cultivars based on their genetic distances. Journal of the American Society for Horticultural Science 58 (1983) 121.
- [4] R. Standish. The first of trees. The story of the olive. Phoenix House 1. Ltd, London (1960)
- [5] D. Boskou. Olive oil, Chemistry and Technology. Champaign, AOCS. (1996)
- [6] J.F. Terral. Wild and cultivated olive (*Olea Europaea* L) a new approach to an old problem. Review of Paleobotany and Palynology 91 (1996) 383-397.
- [7] A. Fernández Gutiérrez, A. Segura Carretero. El aceite de oliva virgen: Tesoro de Andalucía. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja (2009) 9-14.
- [8] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos; (ESYRCE). Resultados Nacionales y Autonómicos. Gobierno de España. (2012)
- [9] Consejo oleícola internacional.
<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/137-lists-of-exporters-importers>. 2012 (2012)
- [10] Esencia de Olivo: Cultura del Aceite de oliva virgen extra.
<http://www.esenciadeolivo.es/aceite-de-oliva/tipos-de-aceite-de-oliva/variedades-de-aceituna/>. (2013)
- [11] A.B. Keys, M. Keys. How to eat well and stay well the mediterranean way. Editorial: Garden City (1975)
- [12] M. Bueno Sánchez. Aceite de oliva y salud. Universidad de Zaragoza (2011)
- [13] Consejo Oleícola Internacional. Congreso sobre Dieta Mediterránea en Palma de Mallorca.

http://www.infoagro.com/noticias/2000/9/15903_el_coi_organiza_mallorca_un_congreso_dieta_mediterranea.asp (4 y 8 de octubre 2000)

- [14] CIAS 2004. Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva y Salud. Jaén - España (2004)
- [15] CIAS 2008. II Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva y Salud. Jaén - Córdoba - España (2008)
- [16] A. Palou Oliver, C. Picó Segura, M.L. Bonet Piña, P. Oliver Vara, F. Serra Vich, A.M. Rodríguez Guerrero, J. Ribot Riutort. El libro blanco de los esteroides vegetales. Unilever Food S.A. 2 (2005) 177.
- [17] J. Humanes, M. Civantos. Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. (1992)
- [18] J.E. Swan, F.J. Trawick. Consumer Satisfaction Research: 1983-1992 Accomplishments and Future Directions. Journal of Consumer Satisfaction, Dissatisfaction and Complaining Behavior 6 (1993) 28-33.
- [19] Reglamento (CE) no 1234/2007 del consejo de 22 de octubre de 2007. Crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM).
- [20] Consejo Oleícola Internacional. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC nº 3 (Rev. 2 24 de noviembre de 2006)
- [21] Reglamento (CE) nº 1989/2003 de la comisión de 6 de noviembre de 2003. Modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Diario Oficial de la Unión Europea (13.11.2003)
- [22] Moreda, W., Pérez Camino, M.C., Cert A. Determinación de algunos parámetros de pureza en aceites de oliva. Resultado de un estudio comparativo. Grasas y Aceites 46 (1995) 279-284.
- [23] Reglamento (CE) nº796/2002 de la Comisión, de 6 de mayo de 2002 (DO L 128 de 15.5.2002), por el que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, así como las notas complementarias que figuran en el anexo del Reglamento (CEE) nº2558/87 del Consejo relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común.

- [24] N. Loyola López, R. López Acevedo, C. Acuña Carrasco. Evaluación sensorial y analítica de la calidad de aceite de oliva virgen. *Revista de agricultura de las zonas áridas - Chile* 26 (2008) 27-2474.
- [25] B. Jiménez Herrera, A. Carpio Dueñas. La cata de aceites: Aceite de oliva virgen. Características organolépticas y análisis sensorial. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca (2008) 134.
- [26] Navarra Gournet. La cata del Aceite de Oliva Extra.
<http://blog.reynogourmet.com/2012/02/la-cata-del-aceite-de-oliva-virgen.html>
2013 (2012)
- [27] Consejo oleícola internacional. Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen. COI/T.20/Doc nº15 (Rev. 1. Noviembre de 1996)
- [28] Reglamento (CE) No 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) no 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- [29] D. Boskou. Olive oil. *World Review of Nutrition & Dietetics* 87 (2000) 56-77.
- [30] A. Agüera, L. Piedra, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, M. Contreras. Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction. *Analyst* 125 (2000) 1397-1402.
- [31] J. Lozano Sánchez, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. Composición del aceite de oliva. Capítulo 7. El aceite de oliva virgen: Tesoro de Andalucía (2009)
- [32] J.J. Murillo, A. Bonilla, J. González, B. Sanz. Estudio de las diferencias entre rendimientos en contenido graso, diversos parámetros de calidad, ácidos grasos y alpha-tocoferol entre nueve variedades de la misma plantación. *Nutrición Hospitalaria* XII (6) (1997) 312-314.
- [33] G. Montedoro, C. Cantarelli. Indagini sulle sostanze fenoliche presenti negli oli d'olive. L a Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse 115 (1969) 2866-2887.
- [34] C.A. Menzie, B.B. Potocki, J. Santodonato. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology* 26 (1992) 1278.
- [35] C. Cantarelli. Sui polifenoli presenti nella drupa e nell'olio di oliva. L a Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse 38 (1961)

- [36] M. Tsimidou. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science* 2 (1998) 99-116.
- [37] G.F. Montedoro, M. Servili, M. Baldioli, E. Miniati. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (1992) 1571-1576.
- [38] M. Brenes, A. García, P. García, J.J. Rios, A. Garrido. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 3535-3540.
- [39] M.J. Garrido Fernández Díez, M.R. Adamos. *Table olives*. Chapman & Hall, London (UK) 1 (1997) 67-109.
- [40] M. Servili, R. Selvaggini, S. Esposto, A. Taticchi, G. Montedoro, G. Morozzi. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A* 1054 (2004) 113-127.
- [41] M.J. Amiot, A. Fleuriet, J.J. Macheix. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34 (1986) 823-826.
- [42] M. Amiot, A. Fleuriet, J. Macheix. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* 28 (1989) 67-69.
- [43] S. Ben Temime, T. Wael, B. Bechir, A. Leila, D. Douja, Z. Mokhtar. Changes in olive oil quality of chétou variety according to origin of plantation. *Journal of Food Lipids* 13 (2006) 88-99.
- [44] A. Tombesi, S. Tombesi, M.M. Saavedra, R. Fernández Escobar. Production techniques in olive growing. *International Olive Council* ISBN: 978-84-931663-6-6 (2007) 323.
- [45] K.M.A. M.I.Al-Maaitah A. Al-Rawashdeh. Oil Quality and Quantity of Three Olive Cultivars as Influenced by Harvesting Date in the Middle and Southern Parts of Jordan. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 11 (2009) 266-272.
- [46] A. Vázquez-Roncero, C. Janer del Valle, M.L. Janer del Valle. Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 22 (1973) 350-355.

- [47] M. Suárez, M. Romero, T. Ramo, A. Macià, M. Motilva. Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 1463–1472.
- [48] S. Fu, D. Arraez-Román, A. Segura-Carretero, J.A. Menéndez, M.P. Menéndez-Gutiérrez, V. Micol, A. Fernández-Gutiérrez. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 643–654.
- [49] E. Valli, A. Bendini, L. Cerretani, S. Fu, A. Segura-Carretero, M.A. Cremonini. Effects of heating on virgin olive oils and their blends: focus on modifications of phenolic fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 8158-66.
- [50] J. Lozano-Sánchez, E. Giambanelli, R. Quirantes-Piné, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez. Wastes Generated during the Storage of Extra Virgin Olive Oil as a Natural Source of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011) 11491-11500.
- [51] R. Maestro Duran, R. Borja Padilla, A. Martín Martín, Fiestas Ros de Ursinos, J. A., J. Alba Mendoza. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Consejo Superior de Investigación Científica* 42 (1991) 271-276.
- [52] E. Perri, A. Raffaelli, G. Sindona. Quantitation of Oleuropein in Virgin Olive Oil by Ionspray Mass Spectrometry-Selected Reaction Monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2000) 647-659.
- [53] G. Montedoro, M. Servili, M. Baldioli, E. Miniati. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (1992) 1577-1580.
- [54] G. Montedoro, J.M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, E. Miniati, A. Macchionii. Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (1993) 2228-2234.
- [55] M. Suárez, A. Macià, M. Romero, M. Motilva. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A* 1214 (2008) 90-99.
- [56] S.M. Cardoso, S. Guyot, N. Marnet, J.A. Lopes-da-Silva, C. MGC Renard, M.A. Coimbra. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace

- by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (2005) 21-32.
- [57] S. Christophoridou, P. Dais. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 633 (2009) 283-292.
- [58] S. Fu, A. Segura-Carretero, D. Arraez-Roman, J.A. Menéndez, A. De La Torre, A. Fernández- Gutiérrez. Tentative Characterization of Novel Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oils by Rapid-Resolution Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 11140–11147.
- [59] Nature Publishing Group. <http://www.nature.com/drugdisc/news/articles/050829-11.html>. 2013 (2005)
- [60] R. Mateos, J.L. Espartero, M. Trujillo, J.J. Ríos, M. León–Camacho, F. Alcudia. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid–phase extraction and high–performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 2185–2192.
- [61] A. Bianco, R.A. Mazzei, C. Melchioni, G. Romeo, M.L. Scarpati, A. Soriero, N. Uccella. Microcomponents of olive oil—III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol. *Food Chemistry* 63 (1998) 461-464.
- [62] M.H. Vissers, P.L. Zock, A.J. Roodenburg, R. Leenen, M.B. Katan. Olive oil phenols are absorbed in humans. *The American Society for Nutritional Sciences* 3 (2002) 409– 417.
- [63] R.W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry* 46 (2000) 976-988.
- [64] M.I. Mínguez-Mosquera, B. Gandul-Rojas, J. Garrido-Fernández, L. Gallardo-Guerrero. Pigments present in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 67 (1990) 192-196.
- [65] L.L. Gutfinger J. Studies of unsaponifiables in several vegetable oils. *Lipids magazine* 9 (1974) 658.
- [66] G. Pita. Funciones de la Vitamina E en la Nutrición Humana. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición* 11 (1997) 46-57.

- [67] M.P. Aguilera, G. Beltrán, D. Ortega, A. Fernández, A. Jiménez, M. Uceda. Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry* 89 (2005) 387-391.
- [68] E. Psomiadou, M. Tsimidou, D. Boskou. α -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 1770-1775.
- [69] P. Manzi, G. Panüli, M. Esti, L. Pizzoferrato. Natural Antioxidants in the Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oils From Different Cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77 (1998) 115-120.
- [70] A. Jiménez, M. Uceda. Características químicas y organolépticas del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. I Simposio del olivo Arbequina en Cataluña, Borges Blanques. . (1995) 145-148.
- [71] M.D. Salvador, F. Aranda, G. Fregapane. Chemical composition of commercial Cornicabra virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. *Journal of the American Oil Chemists Society* 11 (1998) 1305-1311.
- [72] Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A. y Gutiérrez, F. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. (1999) 4150-4155.
- [73] M. Perez-Camino, A. Cert. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 1558-62.
- [74] A. Cert, W. Moreda, J. García-Moreno. Determinación de esteroides y diolcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y Aceites* 48 (1999) 207-218.
- [75] J. Lozano-Sánchez, A. Bendini, R. Quirantes-Piné, L. Cerretani, A. Segura-Carretero, A. Fernández- Gutiérrez. Monitoring the bioactive compounds status of extra-virgin olive oil and storage by-products over the shelf life. *Food Control* 30 (2013) 606-615.
- [76] S. Vichi, A.I. Castellote, L. Pizzale, L.S. Conte, S. Buxaderas, E. López-Tamames. Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* 983 (2003) 19-33.
- [77] F. Angerosa, M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto, G. Montedoro. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A* 1054 (2004) 17-31.

- [78] J. Harwood R. Aparicio. Handbook of Olive Oil: Analysis and properties. Aspen Publ. Inc. Gaithersburg, Maryland (USA) (1999) 355-392.
- [79] J. Sánchez, J.L. Harwood. Byosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. European Journal of Lipid Science and Technology 104 (2002) 564-573.
- [80] M. Williams, J.J. Salas, J. Sanchez, J.L. Harwood. Lipxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). Phytochemistry 53 (2000) 13-19.
- [81] J.M. Olias, A.G. Perez, J.J. Rios, L.C. Sanz. Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the "green" odor notes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41 (1993) 2368-2373.
- [82] M.T. Morales, M. Alonso, J.J. Rios, R. Aparicio. Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43 (1995) 2925-2931.
- [83] F. Angerosa, L. Camera, N. D'Alessandro, G. Mellerio. Characterization of seven new hydrocarbon compounds present in the aroma of virgin olive oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 648-653.
- [84] J. Reiners, W. Grosch. Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 2754-2763.
- [85] G. Luna, M.T. Morales, R. Aparicio. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. Food Chemistry 98 (2006) 243-252.
- [86] M.T. Morales, G. Luna, R. Aparicio. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. Food Chemistry 91 (2005) 293-301.
- [87] R. Aparicio, G. Luna. Characterisation of monovarietal virgin olive oil. European Journal Lipid Science and Technology 104 (2002) 614-627.
- [88] R. Aparicio, M.T. Morales. Characterization of Olive Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Olive Oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 1116-1122.
- [89] D. Tura, O. Failla, D. Bassi, S. Pedò, A. Serraiocco. Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. Scientia Horticulturae 118 (2008) 139-148.
- [90] M.T. Morales, J.J. Ríos, R. Aparicio. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavours and off-flavors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45 (1997) 2666-2673.

- [91] M. Guardia Rubio, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, M.L. Fernández de Córdoba. Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 29 (2006) 1578-86.
- [92] A. Cert Ventulá, Ma. C. Pérez Camino, W. Moreda Martino, R. Rodríguez Acuña. Presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceite de oliva virgen. *Feria Internacional del Aceite de oliva e Industrias Afines - EXPOLIVA Tecnología Oleícola y Calidad* - 48 (2005)
- [93] H. Sharma, V.K. Jain, Z.H. Khan. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. *Chemosphere* 66 (2007) 302-310.
- [94] I. Oller Alberola. Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de fotocátalisis solar y oxidación biológica. Tesis doctoral. Universidad de Almería - España ISBN 8478345795, 9788478345793 (2008) 290.
- [95] B. Gilbert-López, J. Robles-Molina, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz. Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). *Talanta* 83 (2010) 391-399.
- [96] F. Peña, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel. Direct screening of olive oil samples for residual benzene hydrocarbon compounds by headspace-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 526 (2004) 77-82.
- [97] G. Wang, A.S. Lee, M. Lewis, B. Kamath, R.K. Archer. Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 1062.
- [98] I. Stumpe-Vīksna, V. Bartkevičs, A. Kukāre, A. Morozovs. Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chemistry* 110 (2008) 794-797.
- [99] S. Moret, L.S. Conte. A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils. *Journal of Separation Science* 25 (2002) 96-100.
- [100] M. Vidal Carou, R. Farré Rovira, P. Paseiro Losada, P. Burdaspal Pérez, R. López Rodríguez. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en el aceite de orujo de oliva. *Revista del*

- Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria 11 (2010) 21-28.
- [101] J. Lombardero, R. Marín, I. Hernández, J.R. García Hierro. Contaminantes en aceites. http://www.inia.es/gcontrec/pub/97022c301_1058523448500.pdf
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
- [102] K. Bakkali, E. Ballesteros, B. Souhailc, N. Ramos Martos. Determinación de trazas metálicas en aceites vegetales de España y Marruecos mediante espectroscopía de absorción con cámara de grafito después de la digestión en horno de microondas. *Grasas y Aceites* 5 (2009) 490-497.
- [103] S. Bağdat Yaşar, E. Köse Baran, M. Alkan. Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. Metal Determinations in Olive Oil. InTech Europe Capítulo 5 (2012) 510-89-108.
- [104] D.L. Nelson, M.M. Cox. Principio de Bioquímica de Lehninger (4ª ED.). ISBN: 8428214107 (2005)
- [105] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (Versión Revisada). Adoptado por el 123º periodo de sesiones del Consejo de la FAO- ROMA, (2003)
- [106] L. Martínez Nieto, G. Hodaifa, S.R. Vives, J.A.G. Casares, M.S. Casanova. Photodegradation of phytosanitary molecules present in virgin olive oil. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 203 (2009) 1-6.
- [107] S. Malato Rodríguez, J. Blanco Gálvez, C. Estrada Gasca, E. Bandala. Degradación de plaguicidas. Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea. Capítulo 12. .A. Blesa y B. Sánchez (eds.). Editorial CIEMAT (2004) 331-349.
- [108] J. Cáceres Vázquez. Evaluación Analítica y Optimización de Procesos de Oxidación Avanzada en Planta Piloto Solar. Tesis Doctoral. Universidad de Almería - España ISBN: 8478344365, 9788478344369 (2002) 837.
- [109] H.W. Rogg. Manejo integrado y control biológico de plagas y enfermedades. Promoción de Exportadores Agrícolas No Tradicionales (2000)
- [110] T.R. Roberts, D.H. Huston, P.J. Jewess, P.W. Lee, P.H. Nicholls, J.R. Plimmer. Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides Pathways and fungicides. The Royal Society of Chemistry, London, UK (1999) 1475.

- [111] C. Creaser, R. Purchase. Food Contaminants: sources and surveillance. Royal Society of Chemistry (1991)
- [112] Informe de 1975 de la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas. Estudios FAO: Producción y protección vegetal n°1, ó OMS: Serie de Informes Técnicos, n° 592.
- [113] I.E. Tothill, A.P.F. Turner. Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. TrAC Trends in Analytical Chemistry 15 (1996) 178-188.
- [114] J. Rodríguez Jerez. La Radiación Ultravioleta como Descontaminante de Alimentos. Notas científicas y técnicas. La Sociedad Uruguaya de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2004)
- [115] CODEX ALIMENTARIUS. Pesticide Residues in Food. Maximum Residue Limits; Extraneous Maximum Residue Limits. 2010.
- [116] FAO. International Maximum Residue Level Database.
<http://www.mrlatabase.com/> 2013 (2013)
- [117] C. Lentza-Rizos. Monitoring Pesticide Residues in Olive. Products: Organophosphorus Insecticides in Olives and Oil. Journal of AOAC International 77 (1994) 1096-1100.
- [118] A.E. Hiskia, M.E. Atmajidou, D.F. Tsipi. Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Greek Virgin Olive Oil by Capillary Gas Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 570-574.
- [119] R. Sánchez, A. Vázquez, J.C. Andini, J. Villén. Automated multiresidue analysis of pesticides in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption–desorption interface. Journal of Chromatography A 1029 (2004) 167-172.
- [120] M. Maldonado Rubio. Descontaminación de aguas de lavado de envases de plaguicidas mediante fotocátalisis solar. Tesis Doctoral. Universidad de Almería - España (2000)
- [121] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais. Técnicas de Separación en Química Analítica. Editorial Síntesis ISBN: 9788497560283 (2002) 636.
- [122] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernández, J. Hernández-Méndez. Simultaneous determination of phenyl- and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection. Analytica Chimica Acta 517 (2004) 71-79.

- [123] S. Bogialli, A. Di Corcia. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2007) 163-179.
- [124] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta* 79 (2009) 109-128.
- [125] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2007) 195-228.
- [126] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Lozano, A.R. Fernández-Alba, A. Molina-Díaz. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 6022-6035.
- [127] T.D. Nguyen, J.E. Yu, D.M. Lee, G. Lee. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry* 110 (2008) 207-213.
- [128] M. Polo Piñeiro. Desarrollo de nuevos métodos de microextracción en fase sólida para la determinación de contaminantes emergentes en matrices acuosas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela - España ISBN 0-946956-76-6 (2010)
- [129] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. Simultaneous analysis of thiols, sulphides and disulphides in wine aroma by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 849 (1999) 293-297.
- [130] E. González-Toledo, M.D. Prata, M.F. Alpendurada. Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water. *Journal of Chromatography A*, 923 (2001) 45–52.
- [131] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* 880 (2000) 35-62.
- [132] F. Rouessac, A. Rouessac. *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. McGraw Hill ISBN: 9788448137854 (2003) 464.

- [133] M. Guardia-Rubio, M.L. Fernández-de-Córdova, M.J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina. Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1108 (2006) 231-239.
- [134] E. Ballesteros, A. García Sánchez, N. Ramos Martos. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1111 (2006) 89-96.
- [135] S. Lacorté, A.R. Fernandez-Alba. Time of flight mass spectrometry applied o the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 866- 880.
- [136] M. Menager, J.F. Pilichowski, M. Sarakha. Reaction pathways for the photodegradation of the organophosphorus cyanophos in aqueous solutions. *Photochemistry and photobiology* 86 (2010) 247-254.
- [137] E. Pelizzetti, C. Minero, V. Carlin, M. Vincenti, E. Pramauro, M. Dolci. Identification of photocatalytic degradation pathways of 2-Cl-s-triazine herbicides and detection of their decomposition intermediates. *Chemosphere* 24 (1992) 891-910.
- [138] C. Sirtori. Evaluación analítica de productos de transformación biológica, fotoquímica y fotocatalítica de fármacos en agua. Tesis Doctoral. Universidad de Almería - España ISBN 978-950-34-0786-8 (2010)
- [139] I. Ferrer, J.F. García-Reyes, M. Mezcua, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1082 (2005) 81-90.
- [140] F.S. Tanakaa, B.L. Hoffer, R.G. Wien. Photolysis of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-Dimethylurea (Diuron) in dilute aqueous solution. *Toxicological & Environmental Chemistry* 11 (1986) 261 - 269.
- [141] I. Ferrer, E.M. Thurman. *Liquid Chromatography Time-of-flight Spectrometry. Principles, tools, and applications for accurate mass analysis.* New York, NJ: Wiley (2009)
- [142] J.F. García-Reyes, I. Ferrer, E.M. Thurman, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (2005) 2780-2788.

- [143] J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation- degradation" relationships. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 307-321.
- [144] Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- [145] Guidance EU Document n° SANCO 2009/10684. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
- [146] J.H. Gross. *Mass Spectrometry. A Textbook*. Springer, Berlin · Heidelberg, ISBN: 3-540-40739-1 (2004)
- [147] R.P.W. Scott, C.G. Scott, M. Munroe, J. Hess Jr. Interface for on-line liquid chromatography—mass spectroscopy analysis. *Journal of Chromatography* 99 (1974) 395-405.
- [148] R.B. Cole. *Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation and applications*. Wiley Interscience. ISBN: 0-471-14564-5 (1997)
- [149] B.A. Thomson, J.V. Iribarne. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *Journal of Chemical Physics* 71 (1979) 4451-4463.
- [150] J.V. Iribarne, P.J. Dziedzic, B.A. Thomsom. Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* 50 (1983) 331-347.
- [151] J. Zrostlíková, J. Hajšlova, T. Kovalczuk, R. Štípan, J. Poustka. Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 86 (2003) 612-622.
- [152] K.F. Medzihradsky, M.J. Besman, A.L. Burlingame. Structural characterization of site-specific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 69 (1997) 3986-3994.
- [153] M.J. Martínez-Bueno, A. Agüera, M.J. Gómez, M.D. Hernando, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba. Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the

determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 9372-9384.

- [154] J. Klein, L. Alder. Applicability of Gradient Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Simultaneous Screening for About 100 Pesticides in Crops. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 86 (2003) 1015-1037.
- [155] B. Kmetz, P. Fodor, L. Pareja, C. Ferrer, M.A. Martínez-Uroz, A. Valverde, A.R. Fernández-Alba. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1215 (2008) 37-50.
- [156] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 881-899.
- [157] A. Krueve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1187 (2008) 58-66.
- [158] L. Howells, M.J. Sauer. Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MS. *Analyst* 126 (2001) 155-160.
- [159] D. Baglio, D. Kotzias, B.R. Larsen. Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* 854 (1999) 207-220.
- [160] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran. Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *Journal of Chromatography A* 1023 (2004) 67-78.
- [161] B.M. Ham. Even electron mass spectrometry with biomolecule applications. Wiley. New Jersey and Canada. ISBN: 978-0-470-11802-3 (2008)
- [162] S. Lacorte, A.R. Fernández-Alba. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 866-880.
- [163] M. Mezcua, O. Malato, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 81 (2009) 913-929.

- [164] J.M. Herrmann. Heterogeneous photocatalysis: Fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today* 53 (1999) 115-129.
- [165] S. Malato Rodríguez. Procedimientos para la evaluación de la degradación de contaminantes en agua mediante TAOs. *Plataforma Solar de Almería (CIEMAT)*. (2010) 171-188.
- [166] D. Knorr, M. Geulen, T. Grahl, W. Sitzmann. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology* 5 (1994) 71-75.
- [167] A.B. Baranda, A. Barranco, I.M. de Marañón. Fast atrazine photodegradation in water by pulsed light technology. *Water Research* 46 (2012) 669-678.
- [168] Y. Zhang, Y. Hou, Y. Zhang, J. Chen, F. Chen, X. Liao, X. Hu. Reduction of diazinon and dimethoate in apple juice by pulsed electric field treatment. *Journal of the science of food and agriculture* 4 (2012) 743-50.
- [169] F. Chen, L. Zeng, Y. Zhang, X. Liao, Y. Ge, X. Hua, X. Jiang. Degradation behaviour of methamidophos and chlorpyrifos in apple juice treated with pulsed electric fields. *Food Chemistry* 112 (2009) 956-961.
- [170] Y. Zhang, Z. Xiao, F. Chen, Y. Ge, J. Wu, X. Hu. Degradation behavior and products of malathion and chlorpyrifos spiked in apple juice by ultrasonic treatment. *Ultrasonics sonochemistry* 17 (2010) 72-77.
- [171] L.H. Thompson, L.K. Doraiswamy. Sonochemistry: Science and Engineering. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 4 (1999) 1215-1249.
- [172] J. González-García, V. Sáez, I. Tudela, M.I. Díez-García, M.D. Esclapez, O. Louisnard. Sonochemical Treatment of Water Polluted by Chlorinated Organocompounds. A Review. *Water* 2 (2010) 28-74.
- [173] Y. Zhang, W. Zhang, X. Liao, J. Zhang, Y. Hou, Z. Xiao, F. Chen, X. Hu. Degradation of diazinon in apple juice by ultrasonic treatment. *Ultrasonics sonochemistry* 17 (2010) 662-668.
- [174] K.C. Ong, J.N. Cash, M.J. Zabik, M. Siddiq, A.L. Jones. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chemistry* 55 (1996) 153-160.
- [175] G. Reynolds, N. Graham, R. Perry, R.G. Rice. Aqueous ozonolysis of pesticides: A review. *Ozone Science and Engineering* 11 (1989) 339-382.

- [176] K. Whangchai, J. Uthaibutra, S. Phiyanalimat, S. Pengphol, N. Nomura. Effect of ozone treatment on the reduction of chlorpyrifos residues in fresh lychee fruits. *Ozone: Science & Engineering*. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2011.554313> 33 (2011) 232-235.
- [177] J. Wu, T. Luan, C. Lan, T.W. Hung Lo, G.Y.S. Chan. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. *Food Control* 18 (2007) 466-472.
- [178] Y.L. Pang, A.Z. Abdullah, S. Bhatia. Review on sonochemical methods in the presence of catalysts and chemical additives for treatment of organic pollutants in wastewater. *Desalination* 277 (2011) 1-14.
- [179] H. Zhang, L. Duan, D. Zhang. Absorption kinetics of ozone in water with ultrasonic radiation. *Ultrasonics sonochemistry* 14 (2007) 552-556.
- [180] J. Gong, Z. Li, H. Zhong, J. Tang, Y. Li. Ozone/ultrasound degradation effect on residual pesticides in commercially available apples. <http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=05781531> (2010)
- [181] S. Pengphol, J. Uthaibutra, O. Arquero, N. Nomura, K. Whangchai. Oxidative Degradation and Detoxification of Chlorpyrifos by Ultrasonic and Ozone Treatments. *Journal of Agricultural Science* 4 (2012) 164-172.
- [182] R. Prado. Comparación entre lámparas UV de baja presión v/s lámparas UV de media presión. http://www.aqua.cl/pdf/Comparacion_entre_lamparas_UV_de_Baja_vs_Media_Presion.pdf. Universidad Católica de Chile 2011 (2010)
- [183] L. Garcés, F. Mejía, J. Santamaría. La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales. No1. *Revista Lasallista de Investigación* Vol 1 (2005)
- [184] M.I. Litter. Tecnologías avanzadas de oxidación: tecnologías solares. http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/curso/dia_14/5.%20Marta%20Litter.pdf 2011 (Unidad de Actividad Química, Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica. 2008) 73-90.
- [185] E. Gal, P. Aires, E. Chamarro, S. Esplugas. Photochemical degradation of parathion in aqueous solutions. *Water Research* 26 (1992) 911-915.
- [186] L.M.T. Orta, I. Monge, E. López. Estudios de desinfección del agua residual proveniente del Valle de México. Instituto de Ingeniería, UNAM. Proyecto 4340. (1995)

- [187] S. Dauguet, F. Lacoste, B. Ticot. La filière oléagineuse se mobilise autour de la problématique des résidus d'insecticides. *Oleagineux Corps Gras Lipides* 13 (2006) 373-377.
- [188] F. Lacoste, H. Lechat, X. Pages. Contrôle des composés indésirables dans les huiles végétales et mise en place d'observatoires. *Oleagineux Corps Gras Lipides* 12 (2005) 372-377.
- [189] E.G. Amvrazi, T.A. Albanis. Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry* 113 (2009) 253-261.
- [190] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, M. Karim, E.V. Minelli. Persistence of Insecticide Residues in Olives and Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997) 2244-2247.
- [191] E. Amvrazi, T. Albanis. Multiclass pesticide determination in olives and their processing factors in olive oil. Comparison of different olive oil extraction systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 5700-5709.
- [192] P. Cabras, A. Angioni. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 967-973, 0021-8561.
- [193] M. Guardia Rubio, A. Ruiz Medina, M.I. Pascual Reguera, M.L. Fernández de Córdoba. Multiresidue analysis of three groups of pesticides in washing waters from olive processing by solid-phase extraction-gas chromatography with electron capture and thermionic specific detection. *Microchemical Journal* 85 (2007) 257-264.
- [194] M. Guardia Rubio, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, M.J. Ayora Cañada. Influence of Harvesting Method and Washing on the Presence of Pesticide Residues in Olives and Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 8538-8544.
- [195] A. Di Muccio, A. Ausili, R. Dommarco, D. Attard Barbini, A. Santilio, F. Vergori, G. De Merulis, L. Sernicola. Solid-matrix partition for separation of organochlorine pesticide residues from fatty materials. *Journal of Chromatography* 552 (1991) 241-247.
- [196] A. Ramesh, M. Balasubramanian. Rapid preconcentration method for the determination of pyrethroid insecticides in vegetable oils and butter fat and simultaneous determination by gas chromatography-electron capture detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 123 (1998) 1799 - 1802.

- [197] J.J. Vreuls, R.J.J. Swen, V.P. Goudriaan, M.A.T. Kerkhoff, G.A. Jongenotter, U.A.T. Brinkman. Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil. *Journal of Chromatography A* 750 (1996) 275-286.
- [198] A. Di Muccio, T. Generali, D. Attard Barbini, P. Pelosi, A. Ausili, F. Vergori, S. Girolimetti. Single-step separation of organochlorine pesticide residues from fatty materials by combined use of solid-matrix partition and C18 cartridges. *Journal of Chromatography A* 765 (1997) 61-68.
- [199] C. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, E. Visi. Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A* 921 (2001) 297-304.
- [200] L. Rastrelli, K. Totaro, F. De Simone. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography. *Food Chemistry* 79 (2002) 303-305.
- [201] A.M. Tsatsakis, I.N. Tsakiris, M.N. Tzatzarakis, Z.B. Agourakis, M. Tutudaki, A.K. Alegakis. Three-year study of fenthion and dimethoate pesticides in olive oil from organic and conventional cultivation. *Food additives and contaminants* 20 (2003) 553-559.
- [202] K.S. Barrek, O. Paise, M. Grenier-Loustalot. Determination of residual pesticides in olive oil by GC-MS and HPLC-MS after extraction by size-exclusion chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 (2003) 355-359.
- [203] C.S. Tsoutsis, T.A. Albanis. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *International journal of environmental analytical chemistry* 84 (2004) 3-13.
- [204] M.A. Aramendía, M. De Juan, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, J.M. Porras, O.M. Sobrino, F.J. Urbano, R. Vilches. Symposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2005 (Foro de la tecnología oleícola y la calidad (TEC-8)) (2005)
- [205] F.A. Esteve-Turrillas, A. Pastor, M. De La Guardia. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* 553 (2005) 50-57.
- [206] C. Yagüe, S. Bayarri, P. Conchello, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillué, A. Herrera, A. Ariño. Determination of pesticides and PCBs in virgin olive oil by multicolumn

- solid-phase extraction cleanup followed by GC-NPD/ECD and confirmation by ion-trap GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5105-5109.
- [207] C. Ferrer, M.J. Gómez, J.F. García-Reyes, I. Ferrer, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. A*. 1069 (2005) 183-194.
- [208] M.A. Aramendía, V. Borau, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, J.M. Porras, F.J. Urbano. Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (MRM). *Food Chemistry* 97 (2006) 181-188.
- [209] E.G. Amvrazi, T.A. Albanis. Multiresidue method for determination of 35 pesticides in virgin olive oil by using liquid-liquid extraction techniques coupled with solid-phase extraction clean up and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection and electron capture detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 9642-9651.
- [210] J.F. García-Reyes, C. Ferrer, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba, I. Ferrer. Analysis of herbicides in olive oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 6493-6500.
- [211] A.G. Sánchez, N.R. Martos, E. Ballesteros. Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography-tandem mass-spectrometric determination. *Analytica Chimica Acta* 558 (2006) 53-61.
- [212] C. Tsoutsis, I. Konstantinou, D. Hela, T. Albanis. Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 216 (2006) 573-574.
- [213] J.F. García-Reyes, C. Ferrer, M.J. Gómez-Ramos, A.R. Fernández-Alba, A. Molina-Díaz. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 239-251.
- [214] E.M. Díaz-Plaza, J.M. Cortés, A. Vázquez, J. Villén. Automated determination of pesticide residues in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface with electron-capture and nitrogen-phosphorus detectors operating simultaneously. *Journal of Chromatography A* 1174 (2007) 145-150.

- [215] M.A. Aramendía, V. Borau, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, F.J. Urbano. Determination of herbicide residues in olive oil by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 105 (2007) 855-861.
- [216] A.G. Frenich, J.L.F. Moreno, J.L.M. Vidal, F.J.A. Liébanas. Application of gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for the multiresidue analysis of pesticides in olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 8346-8352.
- [217] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovska, J.O. Fernandes, M. Beatriz, P.P. Oliveira. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science* 30 (2007) 620-632.
- [218] A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, E. Pastor-Montoro and R. Romero-González. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2008) 947-959.
- [219] E. Fuentes, M.E. Báez, A. Quiñones. Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. *Journal of Chromatography A* 1207 (2008) 38-45.
- [220] S. López-Feria, S. Cárdenas, M. Valcárcel. One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic–mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7346-7350.
- [221] E. Ballesteros, N. Ramos-Martos. Chapter 47 - Residues of Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Olive and Olive-Pomace Oils by Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (2010) 425-436.
- [222] A. Marinas, F. Lafont, M.A. Aramendía, I.M. García, J.M. Marinas, F.J. Urbano. Chapter 71 - Multiresidue Analysis of Low- and Medium-polarity Pesticides in Olive Oil by GC-MS/MS. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (2010) 667-683.
- [223] G. Dugo, A.G. Potorti, V. Fotia, M. Saitta, V.L.O. Turco. Determination of procymidone in Sicilian olive oils by gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS). *L a Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 87 (2010) 219-225.

- [224] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba, A. Molina-Díaz. Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3736-3747.
- [225] S. Herceg Romanić, M. Matek Sarić, D. Klinčić. Organochlorine Contaminants and Quality of Olive Oil Collected from Olive Oil Growers along the Croatian Adriatic Coast. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* (2011) 1-6.
- [226] E. Sobhanzadeh, N.K.A. Bakar, M.R.B. Abas, K. Nemati. An efficient extraction and clean-up procedure for pesticide determination in olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113 (2011) 862-869.
- [227] J.F. García-Reyes, A. Molina Díaz, C. Ferrer, M.J. Gómez Ramos, A.R. Fernández-Alba. Metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en aceite de oliva y aceituna. *Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines* 62 (2007) 39-59.
- [228] S.M. Walters. Clean-up techniques for pesticides in fatty foods. *Analytica Chimica Acta* 236 (1990) 77-82.
- [229] M.D. Hernando, C. Ferrer, M. Ulaszewska, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 1815-1831.
- [230] H.D. Sharma, S.P. Lewis. Waste containment system, waste stabilization and landfills: design and evaluation. Sangeeta P. Lewis (1994)
- [231] W.L. Masterton. Química general superior . William L Masterton, Emil J Slowinski y Conrad L Stanitski. McGraw Hill. (1993) 803.
- [232] F. Fontúrbel, C. Ibañez, S. Palomeque, S. Salinas, F. Galleguillos. Descontaminación y tratamiento de contaminantes en suelos
. *El Recurso Suelo: Bases Edafológicas. Problemática* (2004)
- [233] R. Wauchope. The pesticide content of surface waters draining from agricultural fields: a review. *Journal of Environmental Quality* 7 (1978) 459–472.
- [234] D.B. Donald, J. Syrgiannis. Occurrence of pesticides in prairie lakes in Saskatchewan in relation to drought and salinity. *Journal of Environmental Quality* 24 (1995) 266-270.

- [235] L. Martínez Nieto, G. Hodaifa, M.S. Casanova. Elimination of pesticide residues from virgin olive oil by ultraviolet light: Preliminary results. *Journal of Hazardous Materials* 168 (2009) 555-559.
- [236] M.V. Ruiz Méndez, Pérez De La Rosa, I., A. Jiménez Márquez, M. Uceda Ojeda. Elimination of pesticides in olive oil by refining using bleaching and deodorization. *Food Addit Contam* 22 (2005) 23–30.
- [237] X. Pages, O. Morin, C. Birot, M. Gaud, S. Fazeuilh, M. Gouband. Raffinage des huiles et des corps gras et élimination des contaminants. *Oleagineux Corps Gras Lipides* 17 (2010) 86-99.
- [238] T. Fukazawa, T. Kobayashi, S. Tokairin, K. Chimi, T. Maruyama, T. Yanagita. Behavior of N-methylcarbamate pesticides during refinement processing of edible oils. *Japan Institute for Oils and Fats and Foods Inspection* 2 (2007) 65-71.
- [239] F. Lafont, I. García, F.J. Gutiérrez. Residuos de Endosulfan en aceite de oliva. *Feria Internacional del Aceite de oliva e Industrias Afines - EXPOLIVA Tecnología Oleícola y Calidad* - 14 (2005)
- [240] G. Dugo, G. Di Bella, L. La Torre, M. Saitta. Rapid GC-FPD determination of organophosphorus pesticide residues in Sicilian and Apulian olive oil. *Food Control* 16 (2005) 435-438.
- [241] European Commission. Commission Decision 2002/657/EC.
http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm
(2012)
- [242] SANCO. Quality Control Procedures for pesticide residues analysis. Document N° SANCO/12495/2011 (2012) 1-40.
- [243] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, M. Beatriz, P.P. Oliveira. Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 73 (2007) 514-522.
- [244] J. Mataix Verdú, F. Palomeque Messía, A. Carpio Dueñas, G. Rodríguez Navarrete. El aceite de oliva: su obtención y propiedades. *Junta de Andalucía* 3 (2009) 1-73.
- [245] M. López-Mesas, M. Crespi. Revisión de los métodos de extracción y purificación de pesticidas de muestras con alto contenido en grasa. *Grasas Aceites* 51 (2000) 183-189.

- [246] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovska, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira. Chapter 70 - Sample Preparation Approaches for the Analysis of Pesticide Residues in Olives and Olive Oils. (2010) 653-666.
- [247] P. Pérez-Ortega, J.F. García-Reyes, N. Ramos Martos, A. Molina-Díaz. Development of an accurate-mass database of 600 organic contaminants using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. XIII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica AA-20 (2012)
- [248] J. Robles-Molina, B. Gilbert-López, J.F. Garcia-Reyes, A. Molina Díaz. Gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry method for monitoring multiclass organic pollutants in Spanish sewage treatment plant seffluents. *Talanta* 111 (2013) 196–205.
- [249] A. R. Fernández-Alba. Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trade Determination of Pesticide Residues. XLIII (2005)
- [250] Reglamento (CE) No 34/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo. Modifican los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) no 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de 2-fenilfenol, ametoctradina, las cepas DSM 14940 y DSM 14941 de *Aureobasidium pullulans*, ciproconazol, difenoconazol, ditiocarbamatos, folpet, propamocarb, espinosad, espiroclorfenol, tebufenpirad y tetraconazol en determinados productos. *Diario Oficial de la Unión Europea* (16/01/2013)
- [251] Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo. Relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica a la Directiva 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* (23/02/2005)
- [252] Reglamento (CE) nº 149/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo. Modifica el Reglamento (CE) no 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo mediante el establecimiento de los anexos II, III y IV que estipulan límites máximos de residuos para los productos que figuran en el anexo I de dicho Reglamento. *Diario Oficial de la Unión Europea* (29/01/2008)
- [253] Reglamento (CE) nº 459/2010 del Parlamento Europeo y del Consejo. Modifican los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) n o 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos. *Diario Oficial de la Unión Europea* (27/05/2010)

- [254] Katagi, T. Photodegradation of pesticides on plant and soil surface. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 182 (2004) 1-189.
- [255] T. Roberts. *Metabolic Pathways of agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*. The Royal Society of Chemistry, London, UK (1998) 1-847.
- [256] S.A. Elmarakby, D. Supplee, R. Cook. Degradation of [¹⁴C] carfentrazone-ethyl under aerobic aquatic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 5285-5293.
- [257] A. Agüera, M.d.M.G. Ramos, A.R. Fernández-Alba. Chapter 2 - Chemical Evaluation of Water Treatment Processes by LC-(Q)TOF-MS: Identification of Transformation Products. *Comprehensive Analytical Chemistry* 58 (2012) 61-109.
- [258] A.R. Fernández-Alba, M.D. Hernando, L. Piedra, Y. Chisti. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* 456 (2002) 303-312.
- [259] United States Environmental Protection Agency, EPA.
<http://www.epa.gov/nrmrl/std/qsar/qsar.html>. Toxicity Estimation Software Tool 2013 (2013)
- [260] M. Flury, J. Leuenberger, B. Studer, H. Fluhler. Transport of anions and herbicides in a loamy and a sandy filed soil. *Water Resources Research* 31 (1995) 823-835.
- [261] M. Tejada. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere* 76 (2009) 365-373.
- [262] G. Bending, S. Lincoln, R. Edmondson. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* 139 (2006) 279-287.
- [263] C. Tixier, M. Sancelme, S. Aït-Aïssa, P. Widehem, F. Bonnemoy, A. Cuer, N. Truffaut, H. Veschambre. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* 46 (2002) 519-526.
- [264] S. Kern, K. Fenner, H.P. Singer, R.P. Schwarzenbach, J. Hollender. Identification of Transformation Products of Organic Contaminants in Natural Waters by

- Computer-Aided Prediction and High-Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology* 18 (2009) 7039–7046.
- [265] P. Aires, E. Gal, E. Chamarro, S. Esplugas. Photochemical degradation of malathion in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 68 (1992) 121-129.
- [266] M.S. Krieger, D.A. Merritt, J.D. Wolt, V.L. Patterson. Concurrent Patterns of Sorption–Degradation for Oryzalin and Degradates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 8 (1998) 3292-3299.
- [267] L. Scrano, S.A. Bufo, M. D'Auria, C. Emmelin. Photochemical behaviour of oxyfluorfen: a diphenyl-ether herbicide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 129 (1999) 65-70.
- [268] A. Vanni, R. Gamberini, A. Calabria, P. Nappi. Determination and identification of metabolites of the fungicides Iprodione and Procymidone in compost. *Chemosphere* 41 (2000) 1431-1439.
- [269] O. Willoughby, Meister Pub. Co. Farm chemicals handbook. (2001.)
- [270] Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina - Departamento de Toxicología - Centro de información y asesoría toxicológica. Guías para el manejo de urgencias toxicológicas. (2008)
- [271] A.J. Cessna. Nonbiological Degradation of Triazine Herbicides: Photolysis and Hydrolysis. *The triazines herbicides* (2008) 329-353.
- [272] C. Chen, S. Yang, Y. Guo, C. Sun, C. Gu, B. Xu. Photolytic destruction of endocrine disruptor atrazine in aqueous solution under UV irradiation: Products and pathways. *Journal of hazardous materials* 172 (2009) 675-684.
- [273] M. Ibáñez, J.V. Sancho, Ó.J. Pozo, F. Hernández. Use of Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry in Environmental Analysis: Elucidation of Transformation Products of Triazine Herbicides in Water after UV Exposure. *Analytical Chemistry* 76 (2004) 1328-1335.
- [274] C. Hu, J.C. Yu, Z. Hao, P.K. Wong. Photocatalytic degradation of triazine-containing azo dyes in aqueous TiO₂ suspensions. *Applied Catalysis B: Environmental* 42 (2003) 47-55.
- [275] S. Sanches, M.T. Barreto Crespo, V.J. Pereira. Drinking water treatment of priority pesticides using low pressure UV photolysis and advanced oxidation processes. *Water research* 44 (2010) 1809-1818.

- [276] S. Nélieu, L. Kerhoas, J. Einhorn. Degradation of Atrazine into Ammeline by Combined Ozone/Hydrogen Peroxide Treatment in Water. *Environmental Science & Technology* 3 (2000) 430-437.
- [277] W. Chu, K.H. Chan, N.J. Graham. Enhancement of ozone oxidation and its associated processes in the presence of surfactant: degradation of atrazine. *Chemosphere* 6 (2006) 931-936.
- [278] S. Klementova, M. Zlamal. Photochemical degradation of triazine herbicides – comparison of homogeneous and heterogeneous photocatalysis. *Photochemical & Photobiological Sciences* 12 (2013) 660–663.
- [279] I. Ferrer, E.M. Thurman. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1175 (2007) 24-37.
- [280] J. Beltran, F.J. López, M. Forcada, F. Hernández. Microextraction procedures combined with large volume injection in capillary gas chromatography for the determination of pesticide residues in environmental aqueous samples. *Analytica Chimica Acta* 356 (1997) 125-133.
- [281] A. Conrad, O. Dedourge, R. Cherrier, M. Couderchet, S. Biagianti. Leaching of terbumeton and terbumeton-desethyl from mini-columns packed with soil aggregates in laboratory conditions. *Chemosphere* 65 (2006) 1600-1609.
- [282] F. Hernández, Ó.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, J.M. Marín, M. Ibáñez. Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC–MS2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 596-612.
- [283] Y. Sanlaville, S. Guittouneau, M. Mansour, E.A. Feicht, P. Meallier, A. Kettrup. Photosensitized degradation of terbuthylazine in water. *Chemosphere* 33 (1996) 353-362.
- [284] K. Lányi, Z. Dinya. Photodegradation study of some triazine-type herbicides. *Microchemical Journal* 75 (2003) 1-13.
- [285] A. Kiss, S. Rapi, C. Csutorás. GC/MS studies on revealing products and reaction mechanism of photodegradation of pesticides. *Microchemical Journal* 85 (2007) 13-20.
- [286] A. Bendini, L. Cerretani, S. Vecchi, A. Carrasco-Pancorbo, G. Lercker. Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or

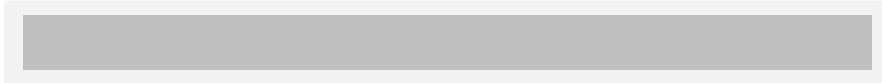
- absence of copper ions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 4880-4887.
- [287] L.C. Matos, J.A. Pereira, P.B. Andrade, R.M. Seabra, M.B.P. Oliveira. Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry* 102 (2007) 976-983.
- [288] J. Morelló, M. Motilva, M. Tovar, M. Romero. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry* 85 (2004) 357-364.
- [289] C. Samaniego-Sánchez, M.J. Oliveras-López, J.J. Quesada-Granados, M. Villalón-Mir, H. ópez-G Serrana. Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114 (2012) 194-204.
- [290] A.I. Méndez, E. Falqué. Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control* 18 (2007) 521-529.
- [291] A. Carrasco-Pancorbo, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, T. Gallina-Toschi, A. Fernandez-Gutiérrez. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science* 28 (2005) 837-58.
- [292] M. Mínguez. *Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos*. Ediciones Universidad de Sevilla. España (1997) Capítulos VI 103-107;VII, p. 111-148;VIII, 155-157.
- [293] F. Caponio, M.T. Bilancia, A. Pasqualone, E. Sikorska, T. Gomes. Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology* 221 (2005) 92-98.
- [294] F. Gutierrez Rosales, C. Gomez Herrera, R. Gutierrez Gonzalez Quijano. Estudio de la cinética de evolución de los índices de calidad del aceite de oliva virgen durante su conservación en envases comerciales. *Grasas y aceites* 39 (1988) 245-253.
- [295] D. Ollivier, J. Artaud, C. Pinatel, J.P. Durbec, M. Guérére. Triacylglycerol and Fatty Acid Compositions of French Virgin Olive Oils. Characterization by Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 5723-5731.
- [296] S. Vichi, L. Pizzale, L.S. Conte. Stereospecific distribution of fatty acids in triacylglycerols of olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109 (2007) 72-78.

- [297] F. Shabihi. Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications. American Oil Chemists' Society (1997) 12–24.
- [298] G. Beltrán, A. Jiménez, M.P. Aguilera, M. Uceda. Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. Relación con la medida de amargor K225 y la estabilidad. *Grasas y aceites* 51 (2000) 320 - 324.
- [299] F. Angerosa, N. d'Alessandro, F. Corana, G. Mellerio. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 736 (1996) 195-203.
- [300] R.W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology* 38 (2000) 647-659.
- [301] C. Romero, M. Brenes, P. García, A. Garrido. Hydroxytyrosol 4- β -D-Glucoside, an Important Phenolic Compound in Olive Fruits and Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 3835-3839.
- [302] M. Brenes, A. García, P. García, A. Garrido. Acid Hydrolysis of Secoiridoid Aglycons during Storage of Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 5609–5614.
- [303] M.J. Lerma-García, E.F. Simó-Alfonso, E. Chiavaro, A. Bendini, G. Lercker, L. Cerretani. Study of Chemical Changes Produced in Virgin Olive Oils with Different Phenolic Contents during an Accelerated Storage Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 7834–7840.
- [304] E. Gimeno, E. Calero, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventós, R.M. De la Torre, M.C. López-Sabater. Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 881 (2000) 255–259.
- [305] A. García, M. Brenes, C. Romero, P. García, A. Garrido. Study of phenolic compounds in virgin olive oils of the Picual variety. *European Food Research and Technology* 215 (2002) 407–412.
- [306] G. Beltrán, M.P. Aguilera, C.D. Rio, S. Sanchez, L. Martinez. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry* 89 (2005) 207-215.

- [307] M. Roca, M.I. Mínguez-Mosquera. Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 832–839.
- [308] A. Kiritsakis, L.R. Dugan. Studies in photooxidation of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62 (1985) 892-896.
- [309] E. Psomiadou, M. Tsimidou. Stability of Virgin Olive Oil.1. Autoxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 716-721.
- [310] E. Psomiadou, M. Tsimidou. Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1988) 5132-5138.
- [311] M. Rahmani, A.S. Csallany. Role of minor constituents in the photooxidation of virgin olive oil. 75 (1998) 837-843.
- [312] D.L. Kiritsakis AK. Role of Minor Constituents in the Photooxidation of Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61 (1984) 1868-1870.
- [313] R.G.Q. Gutierrez, A.V. Romero. Estudios sobre el enranciamiento del aceite de oliva. XI. Comparacion entre las diferentes pruebas para la determinacion del grado de rancidez. *Grasas Aceites* 11 (1960) 67-70.
- [314] A.K. Kiritsakis. Flavor Components of Olive Oil—A Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (1998) 673-680.
- [315] R.A. Flath, R.R. Forrey, D.G. Guadagni. Aroma components of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21 (1973) 948-952.
- [316] F. Angerosa. Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensory panels. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (2002) 639–660.
- [317] A. Barrio Perez-Cerezal, A. Gutierrez Rosales, R. Gutierrez Gonzalez-Quijano. Gas–Liquid Chromatography Application, A Head-Space Technic to the Olive Oils Atrojado Problem. *Grasas Aceites* 32 (1981) 155-161.
- [318] G. Procida, A. Giomo, A. Cichelli, L.S. Conte. Study of volatile compounds of defective virgin olive oils and sensory evaluation: a chemometric approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (2005) 2175–2183.

- [319] L. Di Giovacchino, S. Sestili, D. Di Vincenzo. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (2002) 587–601.
- [320] F. Angerosa, B. Lanza, V. Marsilio. Biogenesis of “fusty” defect in virgin olive oils. *Grasas Aceites* 47 (1996) 142-150.
- [321] F. Angerosa. Sensory quality of olive oils: Handbook of olive oil, Analysis and properties. Harwood J., Aparicio R (Eds.) Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publications Inc. (2000) 355-372.
- [322] R. Aparicio, S.M. Rocha, I. Delgadillo, M.T. Morales. Detection of rancid defect in virgin olive oil by the electronic nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 853-860.
- [323] A. Gómez-Rico, M.D. Salvador, G. Fregapane. Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to ETc in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra and Morisca). *Food Research International* 42 (2009) 1067-1076.
- [324] M.T. Morales, R. Aparicio. Effect of Extraction Conditions on Sensory Quality of Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (1999) 295-300.
- [325] G. Caporale, S. Policastro, E. Monteleone. Bitterness enhancement induced by cut grass odorant (cis-3-hexen-1-ol) in a model olive oil. *Food Quality and Preference* 15 (2004) 219-227.
- [326] G. Luna, M. Morales, R. Aparicio. Changes Induced by UV Radiation during Virgin Olive Oil Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 4790-4794.
- [327] S. Adrover, M.C. Garau, C. Rosselló, S. Simal, A. Femenia. Influence of storage of extra virgin olive oil on physicochemical and sensory parameters.
<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST65Z119012&id=119012>
- [328] J. Ayton, R. Mailer. The effect of storage conditions on the quality of Australian olive oil. *Rural Industries Research and Development Corporation* 12/024 (2012) 79-82.

8. *CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS*



8. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

El mérito obtenido en referencia a la idea de la memoria de esta tesis, fue defendido para la obtención de Grado de Máster Universitario en “Olivar, Aceite de Oliva y Salud”, en la que obtuvo un calificación de 10 (sobresaliente) y el Premio como mejores “Trabajo de Fin de Master 2010” de la Universidad de Jaén.

Los resultados que se incluyen en esta memoria doctoral han sido presentados a congresos de distintos ámbitos.

8.1. Comunicaciones a congresos de ámbito internacional

8.1.1. Título: Study of the UV degradation of pesticides used in olive growth and evaluation of transformation products

Autores: Rafael Pacheco Reyes, Velia Maruxie Yufra Picardo, Juan Francisco García Reyes, Natividad Ramos Martos, M^a Dolores La Rubia García, Antonio Molina Díaz

Tipo de participación: Póster

Congreso: Internacional de Ingeniería Química (ANQUE)

Lugar y fecha: Sevilla, 2012

Corresponde con el capítulo 5.2. de la tesis Doctoral

8.1.2. Título: Degradación de plaguicidas utilizados en el olivar mediante radiación UV

Autores: Velia Maruxie Yufra Picardo, Juan Carlos Domínguez Romero, Rafael Pacheco Reyes, M^a Dolores La Rubia García, Juan Francisco García Reyes, Natividad Ramos Martos, Antonio Molina Díaz.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XVI Symposium Científico Técnico EXPOLIVA (Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines)

Lugar y fecha: Jaén, 2011

Corresponde con el capítulo 5.2. de la tesis Doctoral

8.2. Comunicaciones a congresos de ámbito nacional

8.2.1. Título: Study of the UV degradation of triazine-type herbicides in water and olive oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry

Autores: Velia Maruxie Yufra Picardo, Juan Carlos Domínguez Romero, Rafael Pacheco Reyes, Juan Francisco García Reyes, Natividad Ramos Martos, Antonio Molina Díaz.

Tipo de participación: Póster

Congreso: 13^{as} Jornadas de Análisis Instrumental (JAI)

Lugar y fecha: Barcelona, 2011

Corresponde con el capítulo 5.3 de la tesis Doctoral