



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  

---

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

**TESIS DOCTORAL**  
**ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE LOS  
CONTAMINANTES ORGÁNICOS AL ACEITE  
DE OLIVA VIRGEN DURANTE EL PROCESO  
DE ELABORACIÓN**

**PRESENTADA POR:  
RAFAEL LÓPEZ BLANCO**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. JUAN FCO. GARCIA REYES  
DRA. DÑA. BUENVENIDA GILBERT LÓPEZ**

**JAÉN, 23 DE JUNIO DE 2017**

**ISBN 978-84-9159-301-0**



Los doctores D. Juan Francisco García Reyes, Profesor Titular del Área de Química Analítica y D<sup>a</sup>. Bienvenida Gilbert López, Profesora Sustituta Interina del Área de Química Analítica del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén,

Certifican:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: *“Estudio de la transferencia de los contaminantes orgánicos al aceite de oliva virgen durante el proceso de elaboración”*, ha sido realizada por el Licenciado D. Rafael López Blanco, para la obtención del título de Doctor por la Universidad de Jaén, y que ha sido desarrollada bajo su inmediata dirección y supervisión en el grupo de investigación de Química Analítica (FQM-323) del departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén.

Jaén, a 22 de Mayo de 2017



Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida por la Junta de Andalucía a través del proyecto AGR-6182: *“Desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para la detección y eliminación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva”*. Gracias también a la Universidad de Jaén por el uso de sus instalaciones, de sus recursos y a todo el personal que con su ayuda y buena predisposición han colaborado en todo momento. Al Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la universidad, por el uso de su equipamiento para llevar a cabo mis experimentos. Gracias también a Juan Castro por su ayuda.





# *Agradecimientos*

Me gustaría aprovechar estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han participado y contribuido para la realización de esta tesis doctoral, dedicando su tiempo y recursos de manera desinteresada y en pro de mi propio beneficio.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis Juan Francisco y Bienvenida. Agradezco enormemente la oportunidad que me habéis dado para poder realizar mis estudios de investigación con vosotros. Muchas gracias por todo el tiempo que me habéis dedicado y por todo lo que me habéis enseñado. Desde el primer momento pusisteis la mayor ilusión y confianza para que todo pudiese salir adelante. Espero haberos correspondido.

De igual manera, me gustaría agradecer a Antonio Molina toda la dedicación y ayuda que ha empleado en todo momento. Muchas de las actividades y papeleos habrían sido imposibles sin tu ayuda. Muchas gracias por hacerme formar parte del grupo de investigación y por todo el desempeño que has dedicado conmigo.

Muchas gracias a los tres, si hoy estoy aquí, a las puertas de esta oportunidad, es gracias a vosotros.

Una parte importante de este trabajo se la debo a mis compañeros de grupo: Rocío, David, Robles, Felipe, Jaime y Miriam. Ellos han contribuido enormemente para que todos los trabajos fructificasen, sin vuestra ayuda no hubiera sido posible. Muchas gracias Rocío, por todo lo que me has ayudado, por pringarte las manos y meterte en el laboratorio conmigo. Nunca olvidaré esa semana infernal y a contrarreloj para poder publicar el trabajo del EMR-Lipid, no sé qué hubiera hecho sin ti. Yo solo hubiera tardado un mes. David, qué bueno que viniste —¡uy, qué argentino suena eso... Silvinaaaa!—. Ojalá hubieses llegado antes. Robles muchas gracias por enseñarme lo que sabes y estar dispuesto a resolverme todas las dudas. Felipe, ahora te toca a ti, ánimo. Jaime, gracias por esos minutos de desconexión cuando estoy hasta arriba de trabajo. Y Miriam, muchas gracias por involucrarte y ofrecerte para solucionar mis atascos. Todos habéis sido de ayuda en todo momento, y habéis estado dispuestos a arrimar el hombro. Ahora me toca a mí devolveros, aunque sea un poco de lo que me habéis dado.

Gracias también al resto de compañeros del Departamento de Química Física y Analítica, especialmente a Juan Jesús González. Ya en la carrera y desde el primer día que te conocí te has portado muy bien conmigo. Gracias por ayudarme siempre, por ese ofrecimiento desinteresado y

por todos esos buenos ratos que pasamos juntos. Muchas gracias también al director del departamento Paco Partal, por estar dispuesto a echar una mano para cualquier cosa, por tu involucración y apoyo cuando celebramos el congreso, en fin, por hacernos la vida más fácil. Gracias a los técnicos de laboratorio, Marina, Paco y Cecilia, habéis sido de gran ayuda, a la vez que hemos podido aprender muchas cosas de vosotros.

También me gustaría dedicar un espacio a todas aquellas personas que en algún momento han formado parte del departamento o han estado de visita. A todos los amigos y compañeros que he ido dejando atrás durante la carrera, los masters y los congresos. Siempre es de gran ayuda poder contar con gente que te puedan enseñar cosas nuevas, algún que otro truquillo o simplemente ofrecerte su amistad. Pucelano, iré a verte a Düsseldorf te lo prometo, mucha suerte con la recta final de tu tesis. A mis amiguitos los vascos (cántabra incluida), hace ya que no nos vemos y se os echa de menos. Y a toda la familia del J2IFAM, con gente como vosotros da gusto organizar congresos, sois increíbles, espero que podamos volver a vernos pronto.

En lo personal son muchas las personas a las que tengo que agradecer su cariño.

A toda la familia de los viernes en el Rubio, muchas gracias por vuestra amistad. Vuestra compañía ha sido clave para distraerme cuando me ha hecho falta, y para darme fuerzas para poder trabajar los fines de semana. Nunca olvidaré esos sábados en el recreo después de un largo día de trabajo. Muchas gracias a todos, los que estáis cerca y los que no. Soy muy afortunado de poder contar con vosotros.

Por supuesto, a mi familia. Si he llegado a ser alguien es por todo lo que me habéis dado. Gracias a mis padres Pedro y Ginesa, por inculcarme unos valores y una forma de ser admirable. Por toda la educación recibida, sin preguntar cuántas carreras o masters quiera hacer. Siento haber antepuesto mi trabajo a todo lo demás, sobre todo estos dos años, pero no podía dejar escapar esta oportunidad. Muchas gracias también a mis hermanos, Aurora y Pedro Manuel, gracias por ocupar el hueco que he dejado, por ayudarme y facilitarme las cosas de casa. Gracias también al resto de familia, que tan amplia y dispersa tengo por España, tíos, primos y demás familiares cercanos y seres queridos, gracias por estar ahí en todo momento.

Además, tengo la suerte de tener una segunda familia. Gracias Juan Pedro y María del Mar, por acogerme con vosotros y por hacerme sentir uno más. Desde el primer día me habéis aceptado sin preguntar, y me habéis mostrado todo vuestro cariño. Juan y Paula, os deseo mucha suerte con vuestros estudios seguro que llegaréis lejos.

Y por supuesto, a María del Mar. Eres el principal apoyo que he tenido. Desde que te conozco y sobre todo durante estos años de tesis has depositado toda tu confianza en mí, has sabido aguantar mis genios después del trabajo y he salido reforzado para levantarme al día siguiente con una sonrisa. Esta tesis también es tuya. Has sido todo un ejemplo para mí y puedes dar por hecho que, sin esa retroalimentación para quedarnos un día tras otro hasta anochecer, esto no hubiese salido adelante. Deja ya de darle vueltas al globo terráqueo a ver a dónde nos vamos. Si mientras esté contigo me da igual que haga frío o salga el sol, que sea de día o de noche. Sólo quiero estar cerca tuya. Contigo las penas se convierten en alegrías y los buenos momentos los haces increíbles. Estando a tu lado soy muy feliz. Muchas gracias por todo.

Todos vosotros habéis sido de gran apoyo. Yo, en cambio, he intentado poner todo mi esfuerzo y sacrificio en cada trabajo realizado, espero haber estado a la altura y lo siento mucho si en algo os he defraudado. Os quiero mucho a todos.

Rafael López Blanco



A mis cuatro abuelos/as, *in memoriam*



*«No te digas a ti mismo: “voy a construir el muro más grande, increíble e impresionante que se haya construido jamás”. En vez de eso di: “voy a colocar este ladrillo de la forma más perfecta que se pueda colocar un ladrillo”. Y haz eso todos los días. Así es como se construye un muro».*

(Will Smith)



---

# Índice

---



---

# **ÍNDICE**

RESUMEN.....	21
SUMMARY.....	27
I. OBJETIVOS.....	33
II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	37
II.1.- Importancia socioeconómica del sector oleícola.....	37
II.2.- Especies varietales del olivo en España.....	39
II.3.- Aceites de oliva: clasificación.....	40
II.3.1.- Aceites de oliva vírgenes.....	41
II.3.2.- Aceites de oliva: refinados y mezclas con vírgenes.....	42
II.3.3.- Aceites de orujo de oliva y otros subproductos.....	43
II.4.- Proceso de elaboración del aceite de oliva virgen extra.....	46
II.4.1.- Sistema de extracción de aceite en la almazara.....	46
II.4.2.- Proceso de extracción de aceite de oliva a escala laboratorio: sistema Abencor.....	48
II.5.- Composición de los aceites de oliva.....	49
II.5.1.- Fracción saponificable.....	52
II.5.2.- Fracción insaponificable (componentes minoritarios).....	56
II.5.3.- Contaminantes presentes en los aceites.....	61
II.5.4.- Determinación de contaminantes y constituyentes menores.....	62
II.6.- Plaguicidas utilizados en el cultivo del olivar y otros contaminantes.....	63

---

II.6.1.- Plaguicidas .....	64
II.6.2.- Otros contaminantes, BTEXS .....	68
II.7.- Normativas sobre la presencia de plaguicidas y otros contaminantes en alimentos ...	71
II.8.- Métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas .....	74
II.8.1.- Métodos de extracción .....	74
II.8.2.- Determinación de residuos de plaguicidas mediante técnicas acopladas a espectrometría de masas .....	77
II.8.3.- Criterios para la identificación de iones en espectrometría de masas .....	88
II.8.4.- Antecedentes en la determinación de residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos en aceite de oliva y aceitunas .....	89
II.9.- Métodos analíticos para la determinación de BTEXS .....	92
II.9.1.- Técnicas de espacio de cabeza para la determinación de compuestos volátiles .....	92
II.9.2.- Acoplamiento a la cromatografía de gases: modos de trabajo .....	93
II.9.3.- Antecedentes en la determinación de BTEXS en aceituna y aceite de oliva .....	95
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	99
PARTE I: DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN ACEITES DE OLIVA, ACEITUNA Y OTROS ALIMENTOS DE ALTO CONTENIDO GRASO.....	99
III.1.- Evaluación de diferentes sorbentes utilizados en la etapa de limpieza para el análisis multiresiduo de plaguicidas en matrices de alto contenido graso por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.....	101
III.1.1.- Introduction.....	104
III.1.2.- Experimental.....	106

---

---

III.1.3.- Results and discussion .....	113
III.1.4.- Conclusions.....	142
III.2.- Determinación de plaguicidas polares en aceituna y aceite de oliva mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica acoplada a espectrometría de masas en tándem y de alta resolución .....	143
III.2.1.- Introduction.....	146
III.2.2.- Experimental.....	147
III.2.3.- Results and discussion .....	151
III.2.4.- Concluding remarks.....	158
PARTE II: CÁLCULO DE FACTORES QUE EVALUEN LA TRANSFERENCIA DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS DURANTE EL PROCESADO DE ACEITUNA PARA LA PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.....	159
III.3.- Evaluación de factores de procesado para contaminantes orgánicos durante la producción de aceite de oliva virgen: distribución de BTEXS durante el procesado de aceituna.....	161
III.3.1.- Introduction.....	164
III.3.2.- Experimental.....	165
III.3.3.- Results and discussion .....	174
III.3.4.- Conclusions.....	182
III.4.- Determinación experimental y teórica de los factores de procesado de plaguicidas durante la producción de aceite de oliva virgen extra .....	183
III.4.1.- Introduction.....	186
III.4.2.- Experimental section .....	187
III.4.3.- Results and discussion .....	189

---

III.4.4.- Conclusions.....	200
III.4.5.- Supplementary data .....	201
IV. CONCLUSIONES .....	215
V. BIBLIOGRAFÍA.....	219
VI. ANEXOS.....	239
A) CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS.....	239
Publicaciones en revistas científicas .....	239
Comunicaciones científicas presentadas a congresos.....	240
B) ACRÓNIMOS.....	245
C) ÍNDICE DE TABLAS .....	247
D) ÍNDICE DE FIGURAS .....	250
E) GLOSARIO DE PLAGUICIDAS.....	254

---

---

# Resumen

---



## **RESUMEN**

Los productos fitosanitarios se emplean en los cultivos de todo el mundo para asegurar la producción y el rendimiento de las cosechas. El abuso de estas sustancias conlleva el riesgo potencial de que puedan ser transferidas hasta el alimento, sobre todo si no se siguen las guías de buenas prácticas agrícolas referentes a dosis e intervalos de aplicación. El empleo de una gran variedad de sustancias químicas ha hecho necesaria la regulación de estos compuestos a través del establecimiento de límites máximos de residuos (MRLs) permitidos. La Unión Europea y el *Codex Alimentarius* han establecido criterios sobre la presencia de plaguicidas en alimentos, fijando concentraciones máximas de residuos permitidas en productos de origen vegetal (frutas y verduras) para cada plaguicida. Sin embargo, la disponibilidad de MRLs para productos procesados de origen vegetal, como puede ser el aceite de oliva, los zumos, o el vino, es muy limitada. El anexo VI del Reglamento (CE) 396/2005 dedicado al establecimiento de factores de procesado para productos derivados de origen vegetal está todavía por desarrollar. Como solución provisional, en el caso del aceite de oliva virgen, se ha adoptado un factor de procesado por defecto, únicamente considerando un rendimiento genérico del 20% para el proceso de elaboración. Así, se estima que a partir de 5 kg de aceituna se obtiene 1 kg de aceite, y hay que aplicar un factor de 5 para corregir los valores de los MRLs establecidos para la materia prima de partida (aceituna). Este planteamiento ignora las diferentes propiedades físico-químicas y comportamiento de cada una de las clases químicas de plaguicidas que se emplean. Con este escenario, se hace necesario el estudio de factores de procesado de plaguicidas que puedan ser transferidos al aceite de oliva durante el proceso de elaboración. O lo que es lo mismo, estimar los factores de preconcentración de los plaguicidas durante la etapa de extracción del aceite de oliva.

El propósito principal de esta tesis doctoral es el estudio de la transferencia de plaguicidas presentes en las aceitunas al aceite de oliva durante el proceso de elaboración. También se ha examinado el comportamiento de otros contaminantes ambientales potencialmente presentes en aceite de oliva como el grupo de contaminantes aromáticos monocíclicos "BTEXS". Los objetivos concretos que se han propuesto en la presente tesis doctoral, estructurada como compendio de cuatro artículos de investigación, son los siguientes:

(1) Desarrollar metodologías analíticas multiresiduo basadas en la aplicación de cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución/espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) y cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), adecuadas para la detección/determinación de contaminantes orgánicos (tanto plaguicidas como BTEXS) en alimentos de alto contenido graso —principalmente aceituna y aceite de oliva—, incluyendo

la mejora de la etapa de preparación de muestra y el uso conjunto de distintas técnicas de determinación con el objetivo de abarcar un amplio rango de analitos con diferentes propiedades químicas.

(2) Evaluar la transferencia de plaguicidas y BTEXS durante la producción del aceite de oliva virgen a través del cálculo de factores de procesado, teniendo en cuenta el rendimiento graso del proceso. Para ello, se aplicarán los métodos desarrollados para el análisis de estos compuestos tanto en la aceituna como en el aceite de oliva extraído de ésta mediante el sistema de extracción Abencor. Una vez establecidos factores de procesado individuales para cada analito, se intentarán correlacionar con el coeficiente octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ).

El **artículo 1** (apartado III.1) trata el estudio de nuevas aproximaciones de preparación de muestra para el análisis multirresiduo de plaguicidas en matrices de alto contenido graso, usando el procedimiento de extracción QuEChERS seguido de una etapa de purificación mediante extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Se ha evaluado la eficacia de diferentes combinaciones de sorbentes utilizados en esta etapa de purificación incluyendo C18 + PSA, Z-Sep+ (óxido de zirconio y C18 enlazados a sílica) ó Z-Sep (óxido de zirconio enlazado a sílica) y un sorbente de última generación llamado *Enhanced Matrix Removal-Lipid* (EMR-Lipid), que han sido aplicados a tres matrices vegetales con alto contenido graso como son la aceituna, el aceite de oliva y el aguacate. El estudio se llevó a cabo sobre un total de 67 plaguicidas, evaluando porcentajes de recuperación, efectos matriz, precisión y limpieza de los extractos. La determinación de los analitos fue realizada mediante UHPLC-MS/MS. Los resultados obtenidos en aceite de oliva muestran la viabilidad de la utilización de las tres combinaciones de sorbentes ensayadas. El principal avance que aporta el uso del nuevo sorbente EMR-Lipid con respecto a las combinaciones anteriores, es la mejora de los porcentajes de recuperación, la limpieza de los extractos en comparación con los demás sorbentes utilizados y la consiguiente disminución de los efectos matriz.

En el **artículo 2** (apartado III.2) se han descrito dos métodos para la determinación de plaguicidas con alta polaridad en aceituna y aceite de oliva mediante cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC). Para la detección de los analitos dos técnicas de espectrometría de masas fueron aplicadas: a) espectrometría de masas en tándem (HILIC-MS/MS) utilizando un analizador de triple cuadrupolo operando en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*); b) espectrometría de masas de alta resolución utilizando un analizador de tiempo de vuelo (HILIC-TOFMS). El tratamiento para la preparación de muestra aplicado fue el método QuPpe (*Quick method for polar pesticides*), basado en una extracción líquido-líquido con metanol. Siete plaguicidas polares han sido estudiados: amitrol, cyromazine, diquat, fosetyl-

---

aluminium, mepiquat, paraquat y trimethylsulfonium, evaluando porcentajes de recuperación, efectos matriz, precisión y limpieza de los extractos. Los resultados obtenidos para aceite de oliva fueron satisfactorios, mientras que en aceituna las recuperaciones obtenidas para la extracción de diquat, paraquat y amitrol fueron muy bajas. No obstante, la repetitividad del método era adecuada. Por lo que respecta a los efectos matriz, éstos fueron menores en el caso del aceite de oliva (20% de supresión media), mientras que en la aceituna aparecieron supresiones medias mayores (30-50%). El estudio fue validado para la determinación de los plaguicidas estudiados obteniendo límites de cuantificación por debajo de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  para la mayoría de los casos empleando HILIC-MS/MS.

El **artículo 3** (apartado III.3) se centra en el estudio del comportamiento del grupo de hidrocarburos aromáticos monocíclicos denominados BTEXS (benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos y estireno) que pueden estar presentes en aceite de oliva debido a la contaminación ambiental. Su determinación se realizó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas empleando la técnica de espacio de cabeza (HS-GC-MS). Se llevaron a cabo dos estudios complementarios: (i) el análisis de muestras reales de aceituna procedentes de distintas parcelas de olivar situadas cerca de potenciales fuentes de contaminación; (ii) la determinación de factores de procesado para evaluar la transferencia de estos contaminantes desde su presencia en la materia prima sin procesar (aceituna) hasta el producto elaborado (aceite de oliva virgen extra) durante el proceso de elaboración del mismo. Con respecto a las muestras de aceituna con diferente proximidad a focos de contaminación, como norma general y aunque las concentraciones detectadas eran relativamente bajas, se encontraron valores de BTEXS mayores en las zonas cercanas a la carretera. En cuanto al estudio de su transferencia durante la producción de aceite, el benceno mostró el valor de transferencia más bajo (15%), en consonancia con su mayor solubilidad en agua, mientras que el tolueno y los tres isómeros del xileno presentaron porcentajes de transferencia medios (40-60%), y el etilbenceno y el estireno eran transferidos prácticamente en su totalidad al aceite de oliva (100%).

Por último, el **artículo 4** (apartado III.4) persigue la evaluación de la transferencia de plaguicidas durante la elaboración de aceite de oliva a través del cálculo de factores de procesado. Para llevar a cabo el estudio, se ha empleado un sistema de extracción de aceite de oliva de dos fases a escala de laboratorio (Abencor). Se han seleccionado un total de 104 plaguicidas de diferentes clases químicas que se emplean a nivel mundial en el cultivo del olivar. Para llevar a cabo los balances de materia de los plaguicidas durante el proceso, se ha realizado el análisis de residuos de plaguicidas en aceitunas previamente fortificadas con los diferentes compuestos, y a su vez, del aceite de oliva producido a partir de éstas. Para ello, se emplearon diferentes métodos, incluyendo GC-MS/MS y UHPLC-MS/MS para plaguicidas de baja y media

polaridad, y HILIC-MS/MS para plaguicidas altamente polares y solubles en agua. Los factores de procesado calculados experimentalmente fueron correlacionados con los valores de coeficiente de reparto octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ), obteniendo una relación lineal con un ajuste razonable, teniendo en cuenta las diferentes propiedades físico-químicas de las especies ensayadas. El ajuste fue mucho más preciso cuando se representaron familias concretas de plaguicidas como triazinas, organofosforados o neonicotenoïdes. Estos resultados pueden emplearse para estimar “ab initio” el factor de procesado y comportamiento de nuevos plaguicidas, permitiendo un cálculo de MRLs en aceite de oliva mucho más ajustado a la realidad que el que se practica actualmente según el Reglamento (UE) 2016/662, que sólo se basa en el empleo de un rendimiento industrial de un 20% (rto. graso), para plaguicidas liposolubles sin que haya una definición clara de cuándo se consideran como tales. El porcentaje de transferencia de los plaguicidas desde la aceituna hasta el aceite de oliva durante su elaboración, ha sido evaluado a través del cálculo de factores de procesado, estableciendo dependencias lineales con respecto a sus coeficientes  $\log K_{ow}$ . Los resultados obtenidos han posibilitado plantear una ecuación para predecir la transferencia aproximada de los plaguicidas durante el proceso de elaboración de aceite de oliva y para permitir el cálculo de un MRL en aceite de oliva a partir del  $\log K_{ow}$  y sus respectivos MRLs en aceituna.

---

---

# Summary

---



---

## **SUMMARY**

Agrochemicals are widely used in crops around the world in order to ensure stable production yields. The misuse of these substances may pose a risk to human health, as the excess of pesticides remaining after their application to crops, may persist longer than desired. To avoid an inadequate use of these compounds, official bodies worldwide such as the European Union and the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (through the *Codex Alimentarius*), have established stringent regulations including maximum residue levels (MRLs) set for authorized pesticides in fruits and vegetables. These MRLs have been calculated individually for each raw foodstuff; however, processed products such as olive oil, juice or wine lack of them. Annex VI of the Regulation (CE) 396/2005, which is to be focused in the establishment of processing factors for derivate products from plant origin, have not been development yet. Meanwhile, default processing factors have been adapted, simply taking into account the production yield for fat soluble pesticides. For example, if 5 kg of olives yield 1 kg of olive oil, a preconcentration factor of 5 is applied in order to correct the MRLs values established in the raw material (olives). This approach neglects the different physicochemical properties and behavior of each pesticide used. Beyond this scenario, it is necessary to study the processing factors for each compound that could be transferred to the foodstuff (olive oil) during the production. That are the actual preconcentration factors of these substances during olive oil extraction process.

The main purpose of this doctoral thesis is the study of pesticides transfer from olives during olive oil production. Besides, the behavior of other relevant environmental contaminants potentially present in olive oil, such as the group of monocyclic aromatic contaminants called "BTEXS" has also been evaluated. The specific goals pursued in this work, which comprises four research articles, are the following:

(1) To develop multiresidue analytical methodologies based on ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and gas chromatography/tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) for the accurate determination of pesticides and organic contaminants in olives and olive oil, including the improvement of sample treatment steps.

(2) To evaluate the pesticides and BTEXS transfer during virgin olive oil production through the estimation of processing factors using the fatty yield. To this aim, the previous developed methods will be applied to determine these compounds in olives samples and in the olive oil produced from them by means of the Abencor extraction system. Once the processing factors for

---

each analyte are established, a correlation with partition coefficient octanol-water ( $\log K_{ow}$ ) will be proposed.

**Article 1** (section III.1) includes a thorough study undertaken to improve the sample treatment steps for multiresidue pesticide analyses in fatty commodities such as olives, olive oil and avocado. The QuEChERS methodology has been applied, which consists in a partitioning with acetonitrile followed a purification step (clean-up) of the extracts. Clean-up procedure was studied using three different sorbents: PSA+C18, Z-Sep/+ and EMR-Lipid. These strategies have been compared for a group of 67 representative pesticides in terms of recovery rates, matrix effects, precision and extract cleanliness. The determination of the analytes has been carried out by means of UHPLC-MS/MS. The obtained results in olive oil show the feasibility of these three combinations of sorbents tested. The main advantage in the use of EMR-Lipid compared to the rest of sorbents relies on the improvement of the recovery rates, the obtention of a cleaner extract and the minor matrix effects observed.

In **article 2**, (section III.2) two methods have been developed for the determination of polar pesticides in olives and olive oil samples by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) separation. To detect these analytes, two different mass spectrometry techniques were evaluated: tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) using a triple quadrupole mass spectrometer operated in multiple reaction monitoring mode (MRM), and high resolution mass spectrometry by means of a time of flight mass spectrometer (HILIC-TOFMS), using electrospray ionization in both cases. The QuPPE method (Quick method for polar pesticides) was applied for the sample treatment; it is based on a liquid-liquid extraction with methanol. Seven polar pesticides were tested: amitrol, cyromazine, diquat, fosetyl-aluminium, mepiquat, paraquat and trimethylsulfonium. Different aspects such as recovery rates, matrix effects, precision and extract cleanliness were examined. The results obtained for olive oil were satisfactory, while poor recovery rates were obtained for the extraction of diquat, paraquat and amitrol from olives, although with a reasonable precision. In addition, matrix effects were soft in the case of olive oil (ca. 20% suppression average), while significantly higher suppression was observed for olives (30-50%). The studied approaches were found to be useful for the determination of the pesticides studied in olive oil and olives with limits of quantification below  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  in most cases when tandem mass spectrometry was used.

**Article 3** (section III.3) is focused on the study of the behavior of monocyclic aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and styrene (BTEXS)), species widely distributed in the environment due to the anthropogenic contamination. Their determination was carried out by gas chromatography mass spectrometry using headspace sample

---

introduction (HS-GC-MS). Two different experiments were undertaken: (i) the analysis of real olives samples harvested in olive plots located close to potential contaminant sources such as roads or gas stations; and (ii) the determination of the processing factors with the aim to evaluate the transfer of these contaminants from olives to olive oil, during the production process. The analysis of real olives samples showed higher levels of BTEXS in samples close to roads than the samples inside the olive grove, although the concentrations were relatively low. With respect the study of the behavior of BTEXS during the olive oil production step, benzene showed the lowest processing factor (15%), whereas toluene and xylenes showed an intermediate behavior (40-60%), ethylbenzene and styrene were completely transferred (100%).

Finally, **article 4** (section III.4) evaluates the transfer of a wide number of pesticides during virgin olive oil production through the calculation of processing factors. In order to carry out this study, a laboratory-scale olive oil extraction system (Abencor) was used. Up to 104 pesticides of different physicochemical properties and widely used in olive orchards were selected. To calculate the mass balance of the pesticides during the process, olives samples were spiked with the target compounds and analyzed, and then the olive oil extracted from them was subjected to pesticide analysis as well. For its determination, different analytical techniques depending on the physicochemical properties of the analytes were applied. Thus, highly polar pesticides were analyzed by HILIC-MS/MS, while pesticides with medium to low polarity were studied by LC-MS/MS and volatile species by GC-MS/MS. The calculation of the experimental processing factors allowed to establish a trend with respect their octanol-water partition coefficients ( $\log K_{ow}$ ), obtaining a linear correlation. A more accurate adjustment was obtained when the individual values for each chemical family were performed, for example in triazines, organophosphorous and neonicotinoids. These results can be employed to predict the processing factor and the behavior of new pesticides, allowing the calculation of more realistic MRLs in olive oils than the current Regulation (UE) 2016/662, based on the fatty yield during the olive oil extraction (20%). The use of these parameters (processing factors and distribution coefficient) in addition to fatty yield originated from the extraction procedure was used to propose an equation for the calculation of MRLs in the processed foodstuff (extra virgin olive oil).



---

# Objetivos

---



## **I. OBJETIVOS**

El principal objetivo de la presente tesis doctoral plantea el estudio de la transferencia de residuos de plaguicidas desde la aceituna hasta el aceite de oliva virgen extra durante el proceso de elaboración. La cantidad de plaguicida que puede estar presente en aceituna está regulada por la Unión Europea a través del Reglamento (CE) 396/2005, en el que se establecen límites máximos de residuos (MRLs) para alimentos. Sin embargo, para el caso de productos procesados de origen vegetal, como es el aceite de oliva, la normativa no estipula MRLs específicos. Este tipo de alimentos están regulados en el anexo VI de la citada norma, donde se deben establecer factores de procesado, pero que aún está por desarrollar. Mientras tanto, el Reglamento (UE) 2016/662 sobre el control oficial del cumplimiento de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal, propone para el aceite de oliva virgen un factor de procesado igual a 5 para sustancias liposolubles, (que se corresponde con un rendimiento graso del proceso de extracción de un 20%) y un factor de 1 para sustancias no liposolubles. En esta tesis se propone utilizar un método de cálculo de factores de procesado que tenga en cuenta además otras variables, como las propiedades físico-químicas de los analitos o el coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ). En base a dichos factores de procesado se puede plantear una fórmula para el cálculo de un MRL en aceite de oliva a partir del MRL en aceituna, que introdujese estas otras variables y que no sólo tuviese en cuenta el rendimiento del proceso.

En cuanto a los analitos seleccionados, se han elegido plaguicidas aplicados en el cultivo del olivar y sus productos de degradación, así como otros contaminantes orgánicos relevantes como es el caso de los hidrocarburos aromáticos monocíclicos (BTEXS: benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos y estireno), cuya presencia en aceites está asociada a la proximidad de fuentes de contaminación ambiental relacionada con carburantes (carreteras, gasolineras, etc.).

Los objetivos concretos que se han propuesto en la presente tesis doctoral son los siguientes:

(1) Desarrollar metodologías analíticas multiresiduo basadas en la aplicación de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) y cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), adecuadas para la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos de alto contenido graso —principalmente aceituna y aceite de oliva—, incluyendo la mejora de la etapa de preparación de muestra y el uso conjunto de distintas técnicas de determinación con el objetivo de abarcar un amplio rango de analitos con diferentes propiedades químicas.

(2) Evaluar la transferencia de los plaguicidas y los BTEXS desde la aceituna al aceite de oliva durante la elaboración del mismo a través del cálculo de factores de procesado. Para ello, se aplicarán los métodos desarrollados al análisis de estos compuestos, tanto en la aceituna como en el aceite de oliva extraído de ésta, mediante el sistema de extracción Abencor, teniendo en cuenta el rendimiento graso del proceso. Una vez establecidos factores de procesado individuales para cada analito, se intentará modelizar su comportamiento a través del coeficiente octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ).

---

---

# Introducción y antecedentes

---



## II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### II.1.- Importancia socioeconómica del sector oleícola

El sector oleícola presenta una enorme trascendencia desde el punto de vista económico, tanto a nivel mundial como en los principales países productores. Especialmente en los situados en la cuenca del Mar Mediterráneo, entre los que se encuentra España. Si comparamos los datos de consumo en el mercado mundial, el aceite de oliva representa alrededor del 3% del total de aceites vegetales utilizados con los mismos fines: soja (27%), palma (20%), colza (15%) y girasol (12%), (Aparicio & Harwood, 2003). Sin embargo, el valor que generan el aceite de oliva y sus productos derivados, representan un 15% del volumen mundial del total de aceites vegetales. De ahí su mayor importancia, sobre todo en países mediterráneos, donde el producto interior bruto agrícola (PIBA) de estos estados alcanza una proporción considerable. Así, Siria (17% del PIBA), Grecia (15%), Jordania (15%), Túnez (14%) o España (10%) dependen considerablemente del cultivo del olivar, desde el punto de vista económico, social e incluso, político.

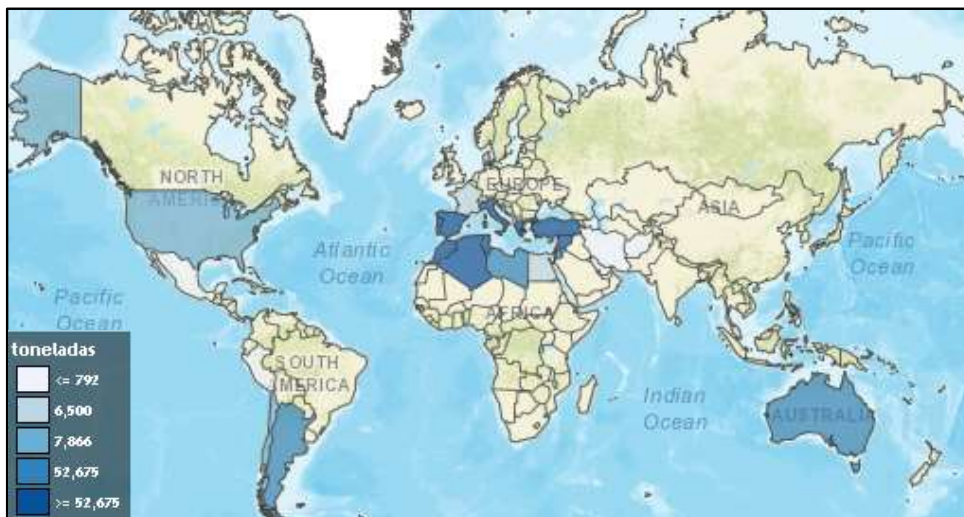


Figura II.1: Mapamundi con los principales países productores de aceite de oliva  
Reproducido con el permiso de Actualix.com a través de creative commons  
Fuente: Food and Agricultural Organization (FAO)

España es claramente la primera potencia mundial (figura II.2) en el sector elaiotécnico y de elaboración de aceitunas de mesa. Por sí misma, es capaz de generar entre el 40-60% de la producción mundial de aceite de oliva (variará en función de la campaña) y consumir alrededor del 20% del mismo (Vilar-Hernández, Cárdenas-García, & Estévez-Alcalde, 2012). Otros países como Italia y Grecia también aportan un porcentaje considerable (25%), aunque la producción de éstos últimos está ligeramente en declive, viéndose afectada por la aparición de nuevas plagas en el sur de Italia y las continuas crisis que vive el estado en el caso de Grecia. Un tercer grupo de países, que incluiría a Turquía, Túnez, Marruecos, Siria, Portugal y Argelia e incluso Argentina y Chile —con un importante aumento en cuanto a superficie de cultivo—, proporciona un 24% de la producción mundial total. El resto de la producción mundial (7%) está más dispersa entre países productores emergentes como EE.UU., China, Australia, etc.

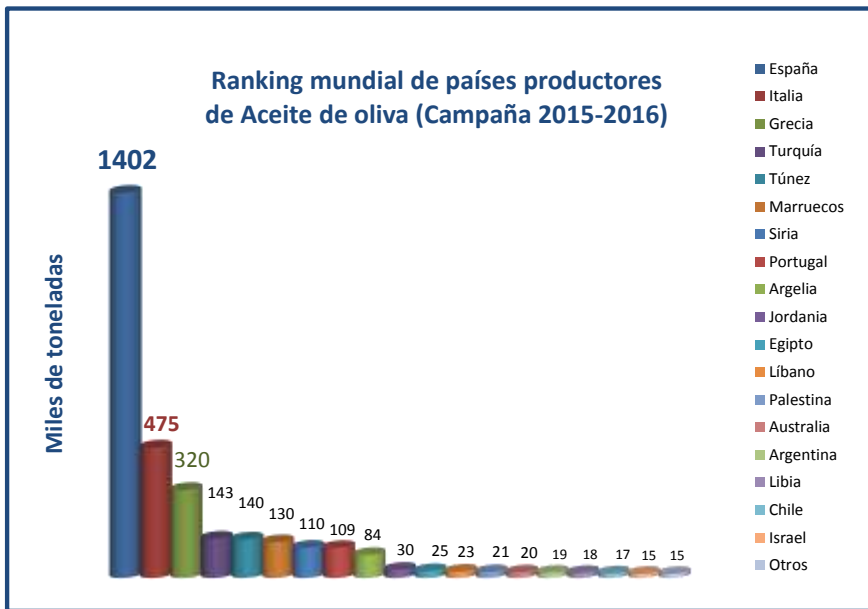


Figura II.2: Datos de producción de aceituna, campaña 2015-2016  
Fuente: Consejo Oleícola Internacional

## II.2.- Especies varietales del olivo en España

Dentro de la especie *Olea europaea L.*, pueden distinguirse conjuntos de individuos que poseen caracteres reconocibles entre sí y a la vez, difieren de otras poblaciones de la misma especie. A estas agrupaciones se le denomina variedades de una especie.

El número de variedades que descienden del olivo es amplísimo. Sólo en España han llegado a catalogarse más de 500 denominaciones varietales diferentes, de las que 262 son cultivadas (Uceda, Aguilera, Jiménez, & Beltrán, 2009). La facilidad de enraizamiento y de propagación del vivero de manera vegetativa, favorece la diversidad de la especie. Además, su longevidad le permite una alta capacidad de dispersión.

Sin embargo, no todas las variedades tienen la misma repercusión. Dependiendo del fin para el que se cultiven, éstas se seleccionan en función de su rendimiento graso, período de maduración, resistencia a determinadas plagas, etc. Del mismo modo, los frutos pueden utilizarse para su consumo como aceitunas de mesa (suelen ser frutos grandes y con bajo rendimiento graso) o bien, emplearse para la producción de aceites de oliva (alto contenido graso). Aquellas que pueden destinarse para ambos objetivos, se denominan de doble aptitud. Una tabla resumen con las propiedades más interesantes de cada variedad se muestra en la tabla II.1.

Tabla II.1: Características más importantes de las especies varietales de olivar  
Fuente: (Uceda et al., 2009)

Variedad	Zona geográfica	Superficie cultivo	Aptitud	Resistencia	Rto. graso
Picual	Jaén, Córdoba	860.000 ha	Aceite de oliva	Frío, salinidad y sequía	Alto
Cornicabra	Montes de Toledo	300.000 ha	Aceite de oliva	Frío, sequía y suelos calizos	Alto
Hojiblanca	Córdoba y Málaga	220.000 ha	Doble	Suelos calizos y sequía	Bajo
Lechín de Sevilla	Sevilla, Córdoba, Cádiz y Málaga	190.000 ha	Aceite de oliva	Repilo y mosca del olivo	Medio
Manzanilla de Sevilla	Sevilla, Huelva y Badajoz	90.000 ha	Aceituna de mesa	Sequía	Medio
Empeltre	Aragón, Baleares y Tarragona	70.000 ha	Aceite de oliva	Verticilosis	Alto
Manzanilla Cacereña	Extremadura	64.000 ha	Doble	Frío, mosca del olivo y repilo	Bajo
Arbequina	Lérida, muy dispersa por España	50.000 ha	Aceite de oliva	Sequía, frío y repilo	Medio
Verdial de Badajoz	Badajoz	29.000 ha	Doble	Sequía	Alto
Gordal Sevillana	Sevilla	12.000 ha	Aceituna de mesa	Frío y humedad	Muy bajo
Aloreña	Álora (Málaga)	11.000 ha	Aceituna de mesa	Tuberculosis	Medio

### II.3.- Aceites de oliva: clasificación

El aceite de oliva está definido por el Consejo Oleícola Internacional (COI) como: “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”.

Existen una serie de factores que influyen sobre las características de las aceitunas. Algunos de estos factores son intrínsecos, es decir, que no son modificables; como la variedad de olivo o la zona geográfica de cultivo. Por otro lado, los factores extrínsecos afectan de forma directa o indirectamente; la poda del árbol, proporciona mayor cantidad de horas de luz; el riego, influye en los caracteres sensoriales y su contenido en polifenoles; el control de plagas y enfermedades, repercute directamente en la calidad del fruto; o el estado de maduración del fruto, cuyo contenido graso variará según éste. Del mismo modo, malas prácticas de recolección pueden producir aceites con propiedades organolépticas muy diferentes, a la vez que variaciones en su composición.

Estos hechos exigen la implicación y una mayor responsabilidad por parte de toda la cadena de producción, desde los agricultores, recolectores y transportistas hasta técnicos de la almazara. Los cuidados de enfermedades son vitales para que el fruto pueda recogerse sano y ausente de defectos. Otro de los puntos clave es la separación de la aceituna de vuelo, es decir, la del árbol y la del suelo. Esta última produce aceite de muy baja calidad. El amontonamiento de los frutos durante el transporte, originan el atrojado por déficit de oxígeno. Al igual que un aumento en el tiempo de espera durante la recepción en la almazara, entraña pérdidas de rendimiento graso.

Todas estas peculiaridades, originan aceites de oliva claramente diferenciables. Los análisis organolépticos discriminan mucho entre los aceites con sabores (fusión de sabor y olor) frutados, y aquellos que presenten defectos, aun siendo ambos beneficiosos y obviamente, aptos para el consumo.

Paralelamente, se intenta prevenir posibles adulteraciones realizadas con otros aceites (girasol, palma, coco, soja...). Para ello, se establecen criterios de calidad y pureza con el fin de asegurar unos intervalos mínimos para cada categoría.

Generalmente el término “aceites de oliva”, se aplica a todos los aceites que se obtienen de la aceituna, sin llegar a especificar sus criterios de calidad. Para hacer referencia a una categoría concreta tendríamos que precisarlo. Las distintas categorías existentes han sido establecidas por

---

---

el COI (COI, 2016), según la norma comercial COI/T.15/NC nº 3/Rev. 10. La última revisión ha sido publicada en 2016 y su contenido se resume en los siguientes puntos.

### II.3.1.- Aceites de oliva vírgenes

Los aceites de oliva vírgenes son aceites obtenidos directamente del fruto del olivo y solamente mediante procedimientos mecánicos o por otros medios físicos, respetando aquellas condiciones térmicas que no produzcan la alteración del aceite, y no hayan tenido más etapas de tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Se excluyen los aceites obtenidos por disolventes, por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de naturaleza diferente.

Todos los aceites de oliva vírgenes son aptos y pueden ser consumidos directamente en la forma en que se obtienen, sin necesidad de tratamientos adicionales. El análisis de contaminantes en los aceites vírgenes es más relevante que en los aceites refinados, ya que estas sustancias se pierden durante la refinación de los mismos (Ruiz Méndez, Pérez de la Rosa, Jiménez Márquez, & Uceda Ojeda, 2005). Las distintas categorías comerciales establecidas por el COI que engloban a dichos aceites son las siguientes:

**Aceite de oliva virgen extra:** es el aceite de máxima calidad, extraído sin aditivos ni conservantes. Preserva intactas todas sus características sensoriales y propiedades beneficiosas. Su acidez libre debe de ser como máximo de 0,8 gramos de ácido oleico por 100 gramos de aceite, y debe cumplir una serie de parámetros físico-químicos establecidos en la norma (COI, 2016). Dicha categoría también está obligada a superar un test de cata, en el que sus atributos organolépticos sean fácilmente identificables, a la vez que no puede presentar defectos sensoriales. Los aceites de oliva vírgenes extra están obligados a etiquetar los envases con la descripción: “Aceite de Oliva de categoría superior obtenido directamente de aceitunas y sólo mediante procedimientos mecánicos”, (Reglamento (UE) 29/2012).

**Aceite de oliva virgen:** es el aceite extraído con calidad inmediatamente inferior al “extra”, sin aditivos ni conservantes. Su acidez libre máxima debe de ser de 2 g de ácido oleico por 100 g de aceite, a la vez que debe cumplir con el resto de parámetros físico-químicos correspondientes a su categoría. Los aceites vírgenes no pueden presentar defectos graves en el panel de cata, aunque sí leves.

Las normas de etiquetado para esta categoría obligan a eliminar de la descripción las palabras “de categoría superior”. La descripción sería: “Aceite de Oliva obtenido directamente de aceitunas y sólo mediante procedimientos mecánicos”.

---

**Aceite de oliva virgen corriente:** es una categoría muy poco conocida. Las últimas modificaciones de la Unión Europea (Reglamento (UE) 1348/2013) no la consideran, aunque si puede estar presente en otros países productores. Considerado de buen gusto, sin embargo, es de entre todos los aceites vírgenes la categoría de menor calidad. 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. Su acidez libre no debe superar los 3,3 g de ácido oleico por 100 g de aceite además de cumplir con el resto de requisitos físico-químicos establecidos por el COI en la norma anteriormente citada.

### II.3.2.- Aceites de oliva: refinados y mezclas con vírgenes

Aquellos aceites de oliva que no pueden ser aptos para el consumo en la forma en que se obtienen, se catalogan como “aceite de oliva virgen lampante”, o más comúnmente aceite de oliva lampante. Suelen tener una acidez superior a un 2% de ácido oleico y sus perfiles organolépticos presentan defectos. Al no ser aptos para el consumo, estos aceites deben sufrir una serie de procesos que mejoren sus características; como son etapas de desgomado para eliminar fosfolípidos, neutralización de ácidos grasos libres o desodorización —eliminación de glicéridos con alto punto de fusión—. Las categorías comerciales aptas para el consumo, derivadas del proceso de refinación de los aceites con menor calidad, son las siguientes:

**Aceite de oliva refinado:** las técnicas de refinado aplicadas provocan una alteración en su estructura glicérica inicial. La acidez libre derivada no debe de ser superior a 0,3 g de ácido oleico por 100 g de aceite, además de satisfacer los parámetros correspondientes a su categoría. A pesar de ser apto, el aceite debido al proceso de refinación pierde olores y sabores característicos, por lo que no tendría sentido comercializarlo con fines alimenticios.

**Aceite de oliva:** contiene mayoritariamente aceites de oliva que se han sometido a un tratamiento de refinado mezclados con pequeñas cantidades de aceites de oliva vírgenes obtenidos directamente de aceitunas. Este proceso se realiza para dotar al aceite con aptitudes organolépticas atrayentes para que pueda ser de interés para su venta al consumo. No debe superar el 1% de acidez. Si otros aceites fueran los utilizados en el proceso, la etiqueta debe especificar: “mezcla de aceites vegetales y de aceite de oliva”.

---

### II.3.3.- Aceites de orujo de oliva y otros subproductos

A lo largo del tiempo han ido surgiendo ideas para el aprovechamiento de subproductos derivados del cultivo del olivo, así como del tratamiento de las aceitunas de mesa y del proceso de extracción de aceites. Los restos de poda pueden ser utilizados para fabricar carbón vegetal debido a su alto poder calorífico e incluso algunos restos de ramas pueden ser utilizados como alimento para ganado debido a su composición similar al heno. Los huesos de aceituna serán aprovechados como combustible en calderas como hollín (La Cal Herrera, 2013). Estos residuos pueden aprovecharse para la producción de biodiesel y bioetanol (Saleh, 2014). Las hojas se pueden utilizar con fines terapéuticos (Carpenter et al., 2006) teniendo una buena utilidad para la hipertensión, arteriosclerosis y diabetes.

Durante el proceso de extracción, al centrifugar la pasta de aceituna, se pueden obtener distintos subproductos dependiendo de las salidas que tenga el decánter horizontal utilizado. Hasta la década de los 90 los decánteres tenían 3 salidas: una fase líquida ligera, el aceite; una fase líquida pesada, aguas vegetales y/o de adición al proceso; y una fase sólida, el orujo. Este orujo poseía un bajo porcentaje en humedad, por lo que se ha venido aprovechando con diferentes fines. El más utilizado es para la extracción del aceite del propio orujo, es decir, la obtención de aceite de orujo de oliva.

El aceite de orujo de oliva es obtenido por tratamiento con disolventes u otros procedimientos físicos, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla de aceites de otra naturaleza. Está reconocido por el COI, e incluso tiene catalogación para su consumo y su uso comercial. Las distintas clases de aceites de orujo de oliva que han sido catalogadas son las siguientes:

**Aceite de orujo de oliva crudo:** se corresponde con el aceite que se extrae del orujo. Es destinado a usos técnicos o a su refinado para el consumo humano, ya que no puede ser consumido directamente. Los requisitos y parámetros físico-químicos que debe cumplir se corresponden con los marcados en la norma del COI para dicha categoría (COI, 2016).

**Aceite de orujo de oliva refinado:** es la categoría correspondiente al aceite de oliva de orujo crudo que ya ha sido refinado. La acidez libre debe de ser como máximo de 0,3 g de ácido oleico por 100 g, a la vez que debe cumplir el resto de características fijadas en la norma. Como ocurre en el caso del aceite de oliva refinado, durante la refinación pierde el olor y el sabor, por lo que se comercializa mezclado con aceites de oliva vírgenes.



Con el paso de los años, y concretamente en el final del siglo pasado, los decánteres evolucionaron a un sistema de extracción de 2 salidas, donde por un lado se obtenía el aceite y por otro una mezcla de orujo con un alto contenido en humedad. Debido a este hecho, se planteó realizar un repaso (o segunda centrifugación) del orujo, del cual se obtendría un aceite de menor calidad, pero igualmente aprovechable, denominándose aceite de orujo de oliva de repaso. El orujo agotado se está empleando como biomasa debido a su poder calorífico e incluso, para la generación de energía eléctrica.

Hoy en día, el aprovechamiento de los subproductos generados durante el proceso de extracción de aceite es un recurso en auge, con la creación de empresas dirigidas a su compraventa o a la transformación de la materia prima con el objetivo de aumentar la valorización del producto y con ello, generar beneficios. Así, restos de poda que el agricultor suele quemar en el campo para evitar plagas podría generar unos ingresos extra al entrar en el proceso de manufacturación. De igual manera, el hueso de aceituna extraído también puede valorizarse secándolo y vendiéndose como combustible para calderas, llegando a conseguir importantes beneficios.

Así pues, no sólo de la venta de aceite de oliva, ya sea del envasado en la misma fábrica o al por mayor, vive el sector. El resto de subproductos también forman parte de una nueva industria con la consecuente aportación económica que puede complementar a la obtenida con su elaboración. La tabla II.2 muestra las características más importantes de los principales subproductos del sector.

**Tabla II.2: Subproductos derivados de la olivicultura y la elaiotecnia**  
Fuente: (Vera Candeas, 2013)

	<b>Restos de poda</b>	<b>Hueso de aceituna</b>	<b>Orujo</b>	<b>Hojas y tallos</b>
<b>Origen</b>	Tallos y hojas procedentes de las labores de poda. Principalmente madera (60%).	Hueso triturado y extraído durante el proceso de elaboración de los aceites de oliva y aceitunas de mesa.	Generado en la extracción de los aceites de oliva. Mezcla de piel, pulpa, cáscara y restos de huesos.	Originado durante las labores de limpieza de la aceituna en la almazara.
<b>Producción</b>	25-30 kg/árbol y año	90-100 kg/t aceituna	600-650 kg/t aceituna	80-100 kg/t aceituna
<b>Aplicaciones</b>	Combustión Gasificación	Combustión	Combustión (orujo)	Pienso y compostaje
<b>Requerimientos previos</b>	Astillado y transporte	Secado solar	Secado	-
<b>Humedad (%)</b>	5-15	20-30	60-70	5-10
<b>Poder calorífico aprovechable (MJ/kg)</b>	15-18	17-19	16-18	12-14
<b>Precio de venta (€/kg)</b>	Gratuito	0.05 (húmedo) 0.15-0.18 (seco)	0.05-0.07	Gratuito
<b>Cenizas (%)</b>	3-5	0.5-2	2-5	8-10

t= tonelada

## II.4.- Proceso de elaboración del aceite de oliva virgen extra

### II.4.1.- Sistema de extracción de aceite en la almazara

El proceso de elaboración de cualquier aceite extraído de la aceituna, comienza en la recolección del fruto, el cual, y dependiendo del estado de maduración en que se encuentre, será destinado para un fin u otro. Aceites “premium”, “primera extracción” y “prensados en frío”, se recogen justo antes del comienzo de la campaña de recolección ordinaria. Algunos elementos a tener en cuenta como los climáticos, agronómicos y técnicos también influirán en la mecanización, agilización y tiempos de duración de la cosecha. Éstos pueden acarrear un importante retraso con los consiguientes perjuicios en cuanto a pérdidas de calidad y rendimiento que podrían provocar en los frutos. Una vez recogida la aceituna se transporta a la almazara, en el menor tiempo posible, donde se realiza el proceso de extracción de aceite.

Las almazaras, por lo general, suelen ser sociedades cooperativas fundadas por socios productores, con el objetivo de defender el precio del aceite y evitar competencias. De esta forma, cosechas de diversas procedencias convergerán en la fábrica para la producción del zumo, por lo que un paso importante antes de su recepción será la adecuada selección de los frutos, para así poder producir un aceite con la máxima calidad.

La recepción suele hacerse en el patio de la misma, volcándose la carga en tolvas. Una vez recibida, se pesa, limpia y prepara para su molturación. Los procesos de lavado son opcionales, aunque sólo serían recomendables cuando la aceituna esté muy sucia (normalmente, cuando ésta procede del suelo). Todas estas etapas de la transformación de la aceituna se representan en la figura II.4.

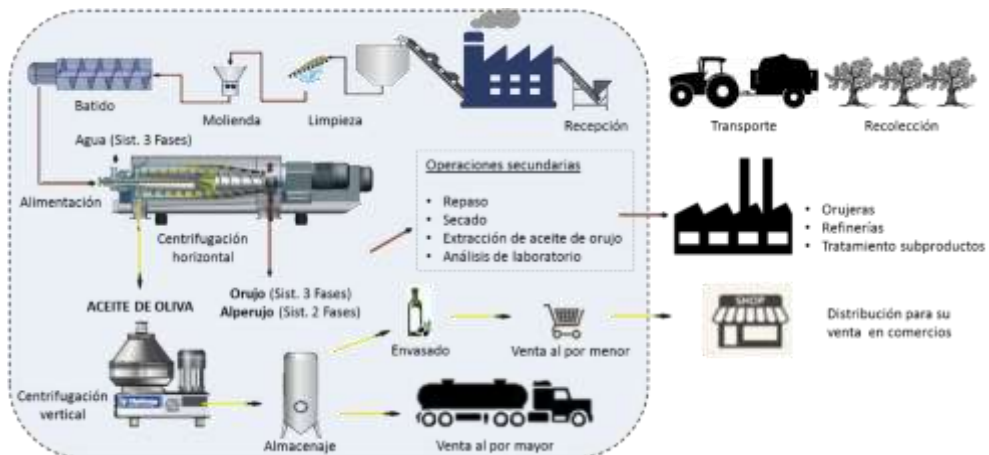


Figura II.4: Proceso completo de extracción del aceite de oliva en la almazara

A partir de aquí, el proceso de extracción de aceite puede dividirse en tres partes claramente diferenciables: la molturación de la aceituna, el batido de la pasta y la decantación o separación de las fases obtenidas. El resto de pasos o etapas adicionales pueden ser consideradas complementarias, en función del diseño de la industria, del aprovechamiento que se quiera hacer de los subproductos o incluso, también dependerá del sistema de eliminación de residuos que tenga la fábrica. Durante las últimas cuatro décadas, las almazaras han sufrido una serie de cambios estructurales, principalmente, en estas tres etapas clave. Antiguamente, los sistemas de molturación consistían en una serie de molinos de empiedros con varias muelas troncocónicas (entre 1 y 4), que se hacían girar alrededor de un eje, realizando el machacado de la aceituna. Una etapa posterior con muelas cilíndricas, aumentaría la fricción entre la pasta generada, favoreciendo la acumulación de las gotas de aceite para una mejor separación. Esta última etapa vendría a ser lo que actualmente conocemos como batido, aunque con el tiempo se fueron introduciendo batidoras similares a las actuales.

Los sistemas para la extracción de aceite durante la primera mitad del siglo XX consistían en una serie de prensas de tornillo, al principio de acción manual y posteriormente reconvertidas a prensas hidráulicas que ejercían una mayor presión sobre los cargos. La pasta de aceituna se depositaba entre capachos fabricados con fibras naturales (esparto principalmente, aunque también se utilizaban sisal o coco). Finalizado el cargo la prensa se accionaba, filtrándose el aceite entre las capas y recogándose el aceite, el cual, se iría decantando por gravedad en pozuelos.

Con el paso de los años, los sistemas fueron mejorando, automatizándose los procesos y secuenciándose de manera continua. Los tiempos de extracción se acortaron, al igual que la mano de obra necesaria para realizar todo el proceso. Actualmente, la molturación de la aceituna se realiza mediante una serie de molinos construidos a base de trituradores de martillo de acero inoxidable, que golpean los frutos contra una criba. El proceso de batido se lleva a cabo en una termobatidora, donde la pasta se hace girar por medio de un tornillo sin fin, a la vez que la temperatura es controlada para favorecer la acumulación del aceite. Una vez batida la pasta, se introduce en un decánter horizontal (figura II.5), es decir, una centrífuga donde la pasta se hace girar de manera que el aceite es separado del resto de fases originadas en el proceso.

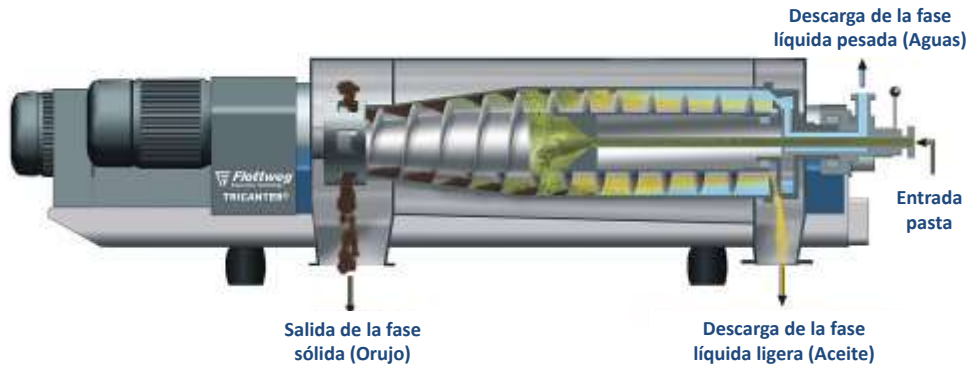


Figura II.5: Decánter horizontal de un sistema continuo de extracción de 3 fases. Reproducido con el permiso de Flottweg, (Alemania)

Esta última introducción, que sustituía a las prensas hidráulicas y los sistemas de extracción de cargos con capachos, permitía realizar el proceso de manera ininterrumpida, a la vez que aumenta el rendimiento graso obtenido de las pastas.

Dependiendo de las distintas salidas incorporadas en el decánter, los subproductos obtenidos son distintos. Por tanto, el resto de maquinaria necesaria complementaria para finalizar el proceso (centrífugas verticales, tamices y otros elementos para el tratamiento de residuos) va a depender de múltiples factores, como por ejemplo el agotamiento de los aceites o el pulido de los mismos, en función de los desechos de la fábrica.

Como consecuencia del exhaustivo control durante la producción de aceituna y extracción de aceite, los aceites de oliva virgen extra poseen características organolépticas muy diferenciables entre ellos. Es común que estos aceites estén asociados a una determinada Denominación de Origen Protegida (DOP) que viene ligada a la zona geográfica de cultivo. Para ello se han de satisfacer una serie de requisitos, con el objetivo de obtener el reconocimiento de una calidad diferenciada y así participar de los beneficios de marca y garantía de los productos ante el consumidor final.

#### II.4.2.- Proceso de extracción de aceite de oliva a escala laboratorio: sistema Abencor

Para llevar a cabo el proceso de extracción de aceite a pequeña escala, existe un sistema comercializado conocido como Abencor, que simula el proceso realizado en la almazara, y que puede utilizarse para la extracción de aceite a escala laboratorio. Este sistema ha sido el utilizado en esta tesis para el estudio sobre el comportamiento de contaminantes en lugar de realizar el

análisis en una almazara por motivos prácticos y para evitar posibles contaminaciones. Además, de esta manera se simplifica todo el proceso, ajustando tamaños de cribas, tiempos de batido o temperaturas de trabajo, aspectos de difícil control en una almazara industrial.

El sistema Abencor está compuesto por 3 elementos: un triturador de aceituna, una termobatidora y una centrífuga vertical. El molino es un triturador-reductor construido en acero inoxidable compuesto por una criba que permite reducir el tamaño de la aceituna triturada. Una vez molidura la aceituna, se deposita en un recipiente de acero inoxidable con forma cilíndrica que será introducido en la termobatidora dotada de un baño de agua para poder regular la temperatura de la pasta. Durante un tiempo (alrededor de media hora) la pasta de aceituna originada será movida por acción de unas palas metálicas de manera que el aceite se irá acumulando, formando una capa oleosa. Como último paso, se produce la centrifugación de la masa durante un minuto a unas 3.500 rpm. Las distintas fases se separan recogiendo el aceite producido en una probeta, mientras que la fase sólida se queda adherida en las paredes del tambor de la centrífuga.



Figura II.6: Sistema Abencor para la extracción de aceite de oliva

## II.5.- Composición de los aceites de oliva

El consumo de grasas y lípidos es clave en nuestra dieta alimentaria. Entre las funciones de éstos se encuentran las reguladoras, de transporte y estructurales. Los lípidos son fundamentales para la formación de membranas celulares y facilitan la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) participando en numerosos procesos hormonales. El aporte calórico de estos compuestos ( $\approx 9$  kcal/g), es casi el doble que en proteínas e hidratos de carbono, constituyendo la principal reserva energética para el organismo (Lozano-Sánchez, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2009).

Los aceites comestibles suelen ser aceites vegetales extraídos de semillas, que han sido sometidos a procesos de refinado para permitir su consumo. Los aceites de oliva, a diferencia del

resto de aceites vegetales, se obtienen directamente del fruto del olivo, la aceituna, siendo un zumo que puede ser consumido directamente sin necesidad de tratamientos adicionales.

La composición de los aceites vegetales, a diferencia de las grasas animales —sólidas a temperatura ambiente—, se caracteriza por tener un alto contenido en ácidos grasos insaturados, lo que les aporta importantes propiedades beneficiosas para la salud. Estos ácidos grasos insaturados se encuentran en un porcentaje muy variable dependiendo de su procedencia. Por ejemplo, el aceite de colza es rico en ácido linoléico (18:3), el de girasol en linoléico (18:2) y el de palma en ácido palmítico (16:0). En la tabla II.3 se muestra un resumen de los ácidos grasos presentes en los aceites vegetales más importantes.

**Tabla II.3: Porcentaje de ácidos grasos en los aceites vegetales más importantes**  
Fuente: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA)

Ac. Grasos (%) Aceites vegetales		Mirístico	Palmítico	Palmitoléico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linoléico
	C<14	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>
Linaza	-	tr.	6.0	tr.	4.5	19	16	54
Girasol	-	-	6.4	tr.	5.0	22.6	63	<0.5
Maíz	-	tr.	10.7	0.5	2.4	26	56	1.0
Soja	-	tr.	9.5	0.2	4.0	22.0	54	7.3
Algodón	-	1.0	23.8	1.0	2.5	18.8	50.2	tr.
Colza	-	tr.	5.0	0.3	2.2	57.0	20.5	9
Oliva	-	tr.	10.0	0.2	3.5	78	6.5	0.3
Cacahuete	-	0.3	9	0.5	3.3	50	27	tr.
Palma	tr.	1.0	43	0.3	4.8	40.0	10	tr.
Estearina palma	tr.	1.0	58.0	tr.	5.1	28.1	6.1	tr.
Palmiste	>50	15.0	8.5	-	1.7	17.1	1.1	-
Coco	>55	17.0	9.0	tr.	2.5	7.0	1.5	tr.
Lecitinas de soja	tr.	0.3	18.1	tr.	4.5	17.8	51.0	7.5

tr.: trazas

El aceite de oliva es el alimento más representativo de la dieta mediterránea. Se caracteriza por su elevada composición en ácidos grasos monoinsaturados —principalmente el ácido oleico— y por una amplia variedad de componentes minoritarios. Numerosos estudios científicos realizados durante las últimas décadas han demostrado la importancia de su consumo en la prevención de: enfermedades cardiovasculares (Estruch et al., 2006; Delgado-Lista et al., 2008; Ruiz-Canela & Martínez-González, 2011); obesidad (Howard et al., 2014); diabetes (Giugliano & Esposito, 2008; Martínez-González et al., 2008; Mozaffarian et al., 2007);

prevención y progresión del cáncer, principalmente de mama, colon o próstata, (Trichopoulou, Lagiou, Kuper, & Trichopoulos, 2000; La Vecchia, 2004); disminución cognitiva relacionada con la edad de aparición del Alzheimer, (Solfrizzi et al., 2005; Solfrizzi et al., 2006). Además, posee otras propiedades que repercuten positivamente en la regulación de los perfiles lipídicos, (Castañer et al., 2011), o el aumento de la esperanza de vida (Trichopoulou & Dilis, 2007; Roman, Carta, Martínez-González, & Serra-Majem, 2008).

Los constituyentes del aceite de oliva se pueden clasificar en dos grupos. Al primero y mayoritario se le denomina fracción saponificable —debido a su capacidad para reaccionar con potasa y formar jabones—. Representa alrededor del 98-99.5% de la grasa y está constituido, casi en su totalidad, por triglicéridos. Sin embargo, una pequeña parte de dicha fracción puede estar compuesta por mono- y diglicéridos debido a reacciones de hidrólisis, que dan lugar también a ácidos grasos libres. Una mayor presencia de estos últimos constituyentes caracterizará al aceite con una mayor acidez, lo que irá en detrimento de su calidad.

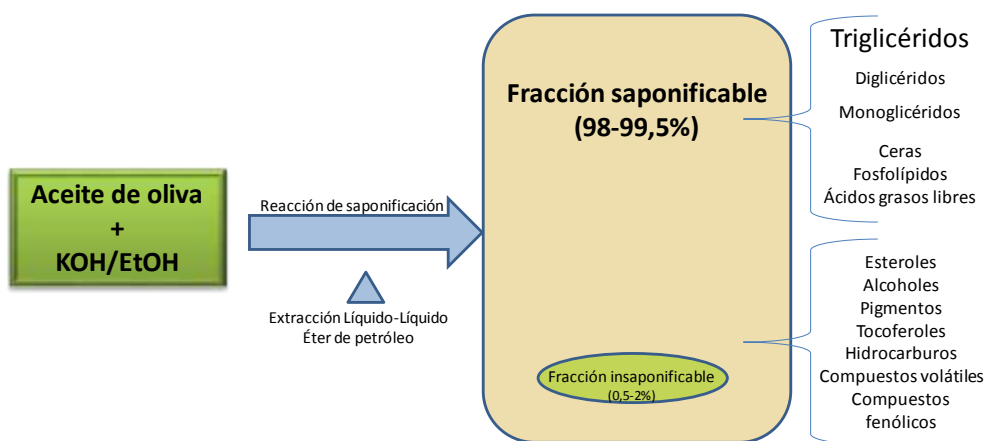


Figura II.7: Esquema de los componentes del aceite de oliva

El segundo grupo está formado por lo que se denomina fracción insaponificable, constituida por una serie de componentes minoritarios (hidrocarburos, alcoholes, esteroides, pigmentos...) que constituyen un porcentaje variable entre el 0,5-2% de su peso. Estos compuestos, a pesar de estar presentes en un porcentaje muy pequeño, son los que caracterizan al aceite de oliva y lo hacen capaz de aportar estas propiedades tan singulares y beneficiosas que tiene para el organismo. La presencia en mayor o menor medida de cada uno de estos compuestos minoritarios va ligada a una serie de factores vinculados con el tipo de variedad de aceituna, grado de maduración del fruto, riego del cultivo, etc. Al tener un perfil muy característico y diferente al de otros aceites de semillas, el análisis de estos componentes es de gran utilidad para la

detección de adulteraciones y mezclas, y además permite establecer una serie de criterios de calidad y pureza para el mismo.

### II.5.1.- Fracción saponificable

#### II.5.1.1.- Ácidos grasos

Los ácidos grasos, generalmente, suelen ser los componentes que en mayor cantidad se encuentran dentro de un aceite o grasa. Sin embargo, raramente se hallan en sus formas libres, sino que se encuentran esterificados con alcoholes, esteroides, fosfátidos o glicerol; formando ceras, fitosteroides, fosfolípidos o glicéridos respectivamente. La mayor cantidad de éstos están presentes en forma de triglicéridos.

Un ácido graso es una cadena hidrocarbonada lineal, habitualmente con un número par de átomos de carbono, que contiene un grupo carboxilo en uno de sus extremos y cuya estructura química se corresponde con  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ . Los ácidos grasos se pueden clasificar en saturados o insaturados según contengan enlaces sencillos o dobles en su estructura (tabla II.4). Si sólo hay un enlace doble podemos denominar al ácido graso como monoinsaturado (MUFA), mientras que para un mayor número de enlaces dobles se designa como poliinsaturado (PUFA). Especialmente particulares son los ácidos grasos calificados como omega-3 y omega-6 cuya síntesis no puede ser realizada por nuestro organismo, por lo que son esenciales en la alimentación al poseer propiedades muy beneficiosas para la salud (López-Miranda et al., 2010). El consumo de ácidos grasos insaturados mejora el perfil lipídico, además de permitir un mayor control sobre enfermedades como la diabetes (Giugliano & Esposito, 2008) o la tolerancia a la glucosa, (Riccardi, Giacco, & Rivellese, 2004). Otro punto a favor del consumo de aceite de oliva, es que su alto porcentaje en ácido oleico (18:1) lo convierte en el principal responsable de la mejora en los niveles de colesterol (Estruch et al., 2006), a la vez que favorece la formación de complejos inhibidores del desarrollo de cánceres como el de mama y ovario (Menendez, Papadimitropoulou, Vellon, & Lupu, 2006).

Tabla II.4: Principales ácidos grasos presentes en la naturaleza

Ácido graso	Nomenclatura*	Procedencia
Ácido butírico	4:0	Leche rumiantes
Ácido caproico	6:0	Leche rumiantes
Ácido caprílico	8:0	Leche rumiantes y aceite de coco
Ácido cáprico	10:0	Leche rumiantes y aceite de coco
Ácido caproleico	10:1 $\omega$ -1	Leche rumiantes

Ácido graso	Nomenclatura*	Procedencia
Ácido láurico	12:0	Aceite de coco, aceite de nuez de palma
Ácido lauroleico	12:1 $\omega$ -3	Leche de vaca
Ácido mirístico	14:0	Aceite de coco, aceite de nuez de palma
Ácido palmítico	16:0	Abundante en todas las grasas
Ácido palmitoleico	16:1 $\omega$ -7	Nuez de macadamia, aceites de pescado
Ácido esteárico	18:0	Grasas animales, cacao
Ácido oleico	18:1 $\omega$ -9	Aceites vegetales (aceite de oliva)
Ácido vaccénico	18:1 $\omega$ -7	Grasas de rumiantes
Ácido linoléico	18:2 $\omega$ -6	Aceites vegetales (aceite de girasol)
Ácido linolénico	18:3 $\omega$ -3	Aceite de soja, otros aceites vegetales
Ácido $\gamma$ -Linolénico	18:3 $\omega$ -6	Aceite de onagra, semillas de borraja
Ácido estearidónico	18:4 $\omega$ -3	Aceites de pescado, semillas de borraja
Ácido araquídico	20:0	Aceite de cacahuete
Ácido gadoleico	20:1 $\omega$ -11	Aceites de pescado
Ácido araquidónico	20:4 $\omega$ -6	Aceites de pescado
Ácido behénico	22:0	Ceras
Ácido cetoleico	22:1 $\omega$ -11	Aceites de pescado
Ácido eúrico	22:1 $\omega$ -9	Aceite de colza
Ácido clupanodónico	22:5 $\omega$ -3	Aceites de pescado
Ácido docosaheptaenoico	22:6 $\omega$ -3	Aceites de pescado
Ácido lignocérico	24:0	Aceite de cacahuete
Ácido cerótico	26:0	Cera de abejas

\* La simbología en la nomenclatura hace referencia en primer lugar al número de átomos de carbono que posee la cadena, mientras que el segundo valor representa el número de insaturaciones. El dígito asociado a la letra  $\omega$  es la posición de la insaturación enumerando los carbonos de forma inversa a la habitual, es decir, por el extremo opuesto al grupo COOH.

Los aceites vegetales suelen estar compuestos por ácidos grasos insaturados, cuyos enlaces dobles hacen que tengan un punto de fusión inferior y se mantengan como líquidos a temperatura ambiente. Sin embargo, otras grasas con una composición rica en ácidos grasos saturados son sólidas, como las mantequillas y margarinas. Los ácidos grasos sintetizados por metabolismos eucariotas poseen sus dobles enlaces en posición *cis* a diferencia de los alterados químicamente. Esto se debe a procesos de hidrogenación que sufren en la industria con el objetivo de solidificarlas y utilizarlas como alimento, originando un cambio en la configuración pasando a ser *trans*. Éstos últimos poseen las propiedades contrarias a los sintetizados naturalmente por lo que su consumo no es recomendable. En el siguiente gráfico (figura II.8) se

pueden ver diferentes alimentos clasificados según su porcentaje en los distintos tipos de ácidos grasos.

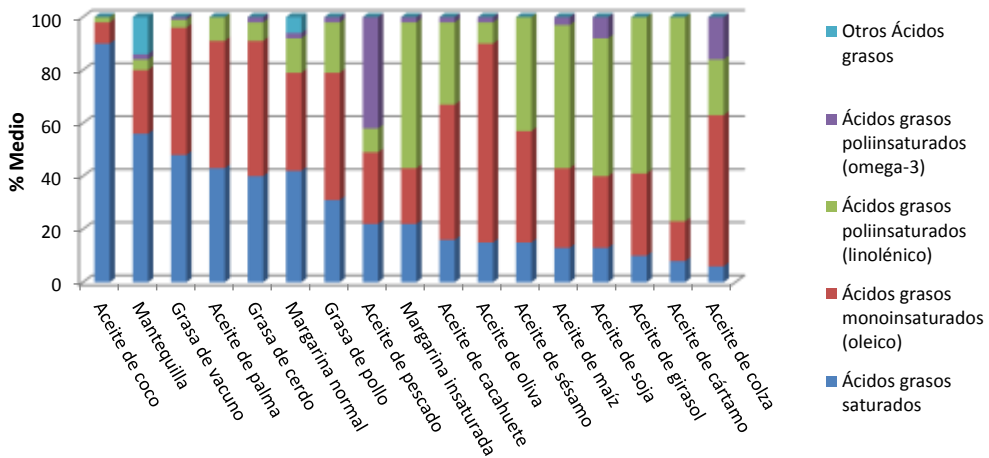


Figura II.8: Composición de ácidos grasos de distintas grasas y aceites consumidos  
Fuente: (Mataix-Verdú, 2001)

De todos los aceites y grasas mostrados, el aceite de oliva es el que presenta mayor proporción en ácidos grasos monoinsaturados, a la vez que muestra una proporción muy baja en ácidos grasos saturados. Estas características lo hacen ideal para su inclusión en una dieta equilibrada. Su componente principal es el ácido oleico (18:1), que suele estar esterificado con glicerol formando triglicéridos, concretamente, trioleínas. Otros ácidos grasos presentes en su perfil lipídico son: mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), heptadecanoico (17:0), heptadecenoico (17:1), esteárico (18:0), linoleico (18:2), linoléico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1), behénico (22:0) y lignocérico (24:0). El análisis del perfil de ácidos grasos es determinante para la evaluación y detección de adulteraciones con otros aceites, principalmente de semillas (COI, 2016).

#### II.5.1.2.- Triglicéridos

Los triglicéridos son el componente principal del aceite de oliva (~98%). Se generan a través de una reacción de esterificación entre los alcoholes de un glicerol y los grupos carboxilos de tres ácidos grasos, formando trioleínas (figura II.9), siendo el ácido oleico el más abundante en dichas moléculas.

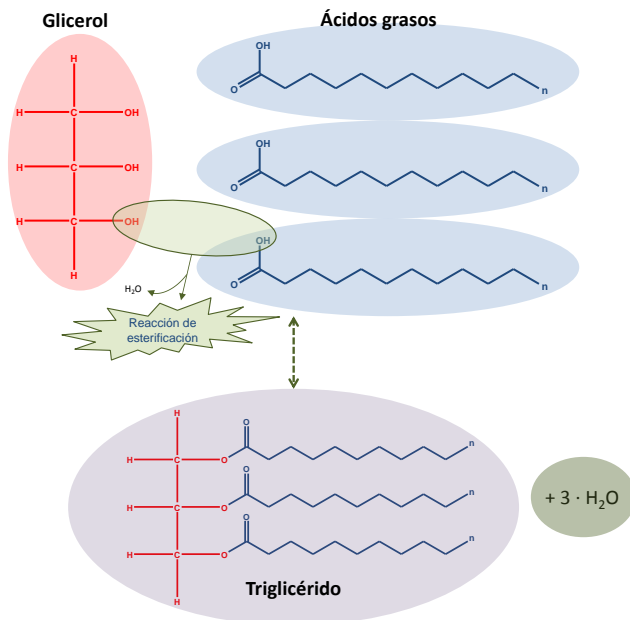


Figura II.9: Reacción de formación de los triglicéridos

La reacción de esterificación, por lo general, sigue un patrón a la hora de unirse con determinados ácidos grasos. La posición 2 de la molécula de glicerol reacciona principalmente con ácidos grasos insaturados, prevaleciendo los poliinsaturados. Sin embargo, se puede dar el caso de que actúe sobre ciertos ácidos grasos saturados cuando la concentración de éstos últimos es muy alta en la grasa.

De igual manera y en presencia de agua, la transformación puede ser reversible dándose una reacción de hidrólisis de la misma, originando mono- o diglicéridos a la vez que ácidos grasos libres, los cuales provocarán un aumento de acidez en detrimento de la calidad del aceite. El proceso también puede ser consecuencia de una incompleta biosíntesis del triglicérido, durante la lipogénesis del aceite en el fruto, aunque suele ser el caso menos probable. El análisis de diacilglicéridos servirá para evaluar la calidad del mismo.

#### II.5.1.3.- Otros componentes minoritarios relacionados con ácidos grasos

Existen una serie de constituyentes minoritarios que se encuentran en los aceites en porcentajes muy pequeños y que han sido formados mediante reacciones de esterificación entre ácidos grasos y otros componentes no glicéridos. Así, los ésteres de ácidos grasos y alcoholes alifáticos originan ceras, mientras que su unión con alcoholes terpénicos origina ésteres

terpénicos. Análogamente los ácidos grasos pueden estar esterificados con esteroides (ver apartado II.5.2.4). Dichos ésteres se rompen durante la reacción de saponificación separándose las partes glicéridas.

Del mismo modo aparecen fosfolípidos, que son los componentes estructurales que constituyen las membranas celulares. Su estructura es similar a la de los triglicéridos salvo por la presencia de grupos fosfátidos en la misma, lo que le atribuye cierto carácter polar a la molécula.

### II.5.2.- Fracción insaponificable (componentes minoritarios)

La fracción insaponificable está constituida en su totalidad por una serie de componentes minoritarios que se encuentran en el aceite en un porcentaje muy pequeño (0.5-2%), pero que son los elementos esenciales para su caracterización. La descripción de éstos componentes minoritarios se detalla a continuación (Kiritsakis & Christie, 2003; Lozano-Sánchez et al., 2009).

#### II.5.2.1.- Hidrocarburos

Los hidrocarburos están presentes tanto en aceites como en grasas y existen de diversa naturaleza, encontrando tanto saturados como insaturados. Los principales hidrocarburos que podemos encontrar en el aceite de oliva son el escualeno y el  $\beta$ -caroteno, pertenecientes a la familia de los hidrocarburos terpénicos (Lozano-Sánchez et al., 2009).

El escualeno se encuentra en una proporción muy alta, alrededor de un 40% del total de hidrocarburos presentes en el aceite. Es un compuesto habitual en el aceite de hígado de tiburón, y exclusivo en el aceite de oliva de entre todos los aceites vegetales. Está formado por una cadena de 30 átomos de carbono con varios dobles enlaces en su estructura.

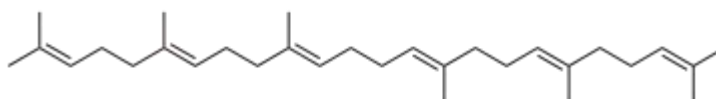


Figura II.10: Estructura del escualeno ( $C_{30}H_{50}$ )

El  $\beta$ -caroteno es el constituyente más importante de la familia de los carotenos, que son pigmentos presentes en el aceite de oliva. Los carotenos engloban varios isómeros estructurales ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta$ -caroteno entre ellos). Actúan como reductores o antioxidantes que ayudan a neutralizar los radicales libres. Su contenido en el aceite varía en función de la época de recolección —encontrándose en mayor proporción al principio de campaña—. Poseen

estructuras insaturadas con enlaces etilénicos conjugados, responsables del color amarillento del aceite. El consumo de  $\beta$ -caroteno (transformado en vitamina A por el organismo) aporta numerosos beneficios al correcto funcionamiento del sistema inmunológico, la proliferación celular de la piel y la conservación de la visión.

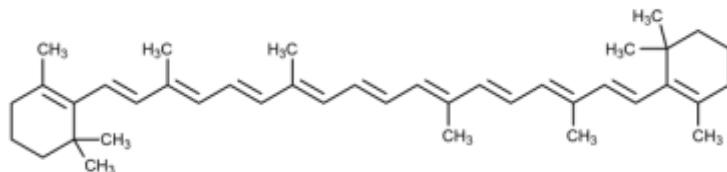


Figura II.11: Estructura del  $\beta$ -Caroteno ( $C_{40}H_{56}$ )

Otros hidrocarburos destacables son los esteroideos (destacando el estigmastadieno), que se encuentran en un porcentaje muy pequeño en los aceites de oliva vírgenes. Durante el proceso de refinación, los alcoholes se deshidratan formando estigmastadienos, aumentando su concentración durante el proceso de refinado. Su análisis puede permitir la detección de adulteraciones de los aceites vírgenes con otros aceites refinados.

#### II.5.2.2.- Tocoferoles

Los tocoferoles son un grupo de antioxidantes naturales que se encuentran en mayor porcentaje en los aceites vegetales y que los dotan de una gran estabilidad ante la oxidación, reaccionando con radicales peróxido de los ácidos grasos (Kiritsakis & Christie, 2003). El más abundante en el aceite de oliva es el  $\alpha$ -tocoferol, que presenta una destacable actividad biológica (vitamina E). Además de éste, otros isómeros como el beta o el gamma también aparecen aunque en menor porcentaje. El contenido total de tocoferoles depende mucho de la variedad de aceituna que se cultive. Así, la variedad picual presenta un mayor contenido en dichos compuestos, lo que la caracteriza con unos sabores amargos y picantes típicos.

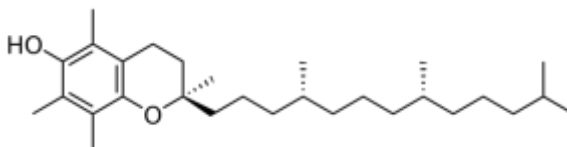


Figura II.12: Estructura del  $\alpha$ -Tocoferol ( $C_{29}H_{50}O_2$ )

### II.5.2.3.- Alcoholes alifáticos y terpénicos

Los alcoholes alifáticos poseen una estructura de cadena hidrocarbonada lineal y saturada. En los aceites pueden encontrarse: monoconasol (C21), diconasol (C22), triconasol (C23), tetraconasol (C24), pentaconasol (C25), hexaconasol (C26), heptaconasol (C27) y octanoconasol (C28), (Lozano-Sánchez et al., 2009). En el aceite de oliva predominan, especialmente, aquellos con número par de átomos de carbono, a la vez que el resto se presentan en un porcentaje muy bajo. Su análisis es obligatorio y se utiliza para distinguir entre los aceites extraídos mecánicamente (aceites de oliva vírgenes) y los extraídos mediante disolventes (aceites de oliva de orujo). Son los precursores de las ceras (éster de ácido graso y alcohol alifático), por lo que un mayor porcentaje de estos aumentará la probabilidad de que se den reacciones de esterificación y la consecuente aparición de ceras.

Los alcoholes terpénicos están presentes en un amplio porcentaje de la fracción insaponificable, formando estructuras tetracíclicas o pentacíclicas. Los compuestos más importantes que se encuentran en el aceite de oliva pertenecen a este segundo grupo y son el eritrodol y el uvaol. Una proporción mayor de éstos reside en la epidermis del fruto y por tanto, su presencia será mayor en aceites de orujo de oliva. Su análisis contribuirá a la detección de adulteraciones, aunque es recomendable complementarlo con una valoración conjunta al contenido de ceras y alcoholes alifáticos para confirmar la adulteración.

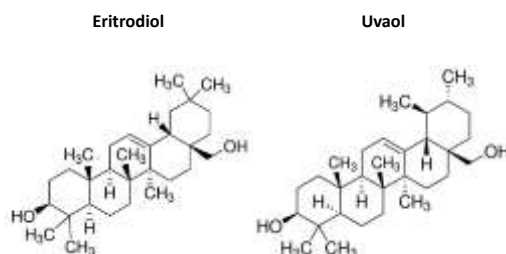


Figura II.13: Estructuras químicas de sus isómeros estructurales (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>)

### II.5.2.4.- Esteroles

Pertenecen al grupo de los esteroides, cuya estructura básica es el ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano (figura II.14). Son alcoholes esteroideos caracterizados por tener en el C3 un grupo OH y un grupo funcional en el C17, que variará en función del esteroide en cuestión (Lozano-Sánchez et al., 2009). Los principales esteroides presentes en el aceite de oliva son el  $\beta$ -Sitosterol, el  $\Delta$ -5-avenasterol y el campesterol.

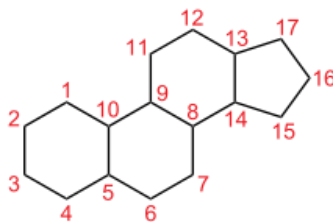


Figura II.14: Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno ( $C_{17}H_{28}$ )

### II.5.2.5.- Pigmentos

Las clorofilas y los carotenoides son los pigmentos más comunes que podemos encontrar en el aceite de oliva. Son los responsables del color verde-amarillento que posee. Dependen mucho del grado de madurez que tenga el fruto, lo que hará variar la relación entre ambos constituyentes, haciendo predominar el color verde a principios de campaña —mayor proporción de clorofilas— o el amarillo al final —mayor proporción de carotenos.

Las clorofilas son un grupo importante de antioxidantes presentes en el aceite de oliva (Lozano-Sánchez et al., 2009). Están formadas por un anillo de porfirina con un átomo de Mg en su centro estructural y un alcohol terpénico esterificado a su estructura. Existen dos formas similares de la misma *a* y *b*: *a*, con un grupo metilo; *b*, con un grupo formilo (figura II.15). De igual manera, es frecuente hallar ambos derivados de éstas denominados feofitinas y cuyas estructuras son idénticas a sus respectivas salvo por la ausencia del metal ( $Mg^{+2}$ ).

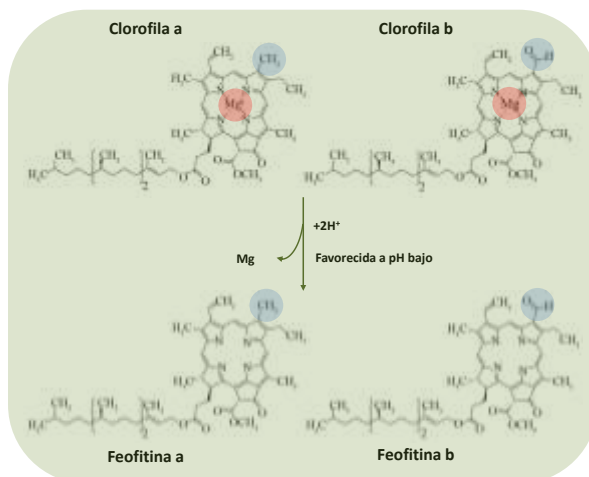


Figura II.15: Estructuras de los pigmentos clorofilicos y sus derivadas feofitinas

Los carotenoides son terpenos, generalmente de 40 átomos de carbono. Se dividen en carotenos (no oxigenados) y xantofilas (oxigenados). Entre los carotenoides que constituyen el aceite de oliva, podemos encontrar la luteína, neoxantina, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno (ver II.5.2.1), siendo mayoritaria la luteína (Lozano-Sánchez et al., 2009).

El contenido de ellos va a depender de factores extrínsecos al fruto. Así, la molturación de las aceitunas o los sistemas de extracción empleados influirán en su contenido. Por ejemplo, la concentración de carotenoides será mayor en los aceites extraídos mediante sistemas de centrifugación, a diferencia de los sistemas de prensas empleados hace unas décadas.

La concentración de pigmentos es mayor en los aceites vírgenes, a diferencia de los que han sufrido el proceso de refinado cuyo contenido disminuye, perdiéndose prácticamente por completo durante la etapa de decoloración.

#### II.5.2.6.- Compuestos fenólicos

La existencia de componentes fenólicos en los aceites de oliva se debe a su presencia en el mesocarpio de la aceituna, caracterizando a dichos aceites por ser los únicos de origen vegetal que presentan este tipo de estructuras. Son los responsables de la estabilidad del mismo, es decir, actúan frente a la oxidación, siendo identificados como principales causantes de sus capacidades antioxidantes (Lozano-Sánchez et al., 2009). Además, aportan aromas y sabores característicos, relacionados con la astringencia y el amargo. Por ejemplo, los aceites de oliva obtenidos de la variedad picual suelen ser aceites muy estables, pero en contrapartida presentan sabores amargos que no gustan a todos los consumidores.

La concentración de fenoles presentes en los aceites depende de múltiples factores: maduración del fruto, tipo de sistema de extracción empleado, modo de trituración de la aceituna, variedad de olivo, etc. (Kiritsakis & Christie, 2003). La presencia de estos compuestos suele estar vinculada, en gran medida, a las propiedades saludables asociadas al consumo moderado del mismo, existente sólo en los aceites de oliva vírgenes ya que los fenoles se pierden durante la etapa de refinado.

---

### II.5.2.7.- Constituyentes volátiles responsables del aroma

El aceite de oliva virgen extra presenta unas notables características organolépticas debido a su extracción mediante procedimientos mecánicos. A diferencia de los aceites de oliva refinados, los aceites vírgenes conservan su aroma natural, el cual se refleja a través de la presencia de constituyentes volátiles en el aceite. Son estructuras muy diversas, de bajo peso molecular y que tienden a evaporarse a temperatura ambiente. Su detección mediante la cata es una etapa clave para la caracterización de los aceites de oliva como vírgenes extra, e imprescindible para su catalogación. La presencia de defectos en el mismo obligará a su degradación a virgen siempre y cuando cumpla el resto de requerimientos de calidad y pureza.

Existen numerosas estructuras responsables del aroma, como pueden ser aldehídos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos o cetonas entre ellas. La presencia de estos compuestos en los aceites de oliva se debe a su biosíntesis durante la ruta de la lipoxigenasa (Salas Liñan, 1998), la cual es un conjunto de reacciones bioquímicas que se inicia a partir de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. En los aceites de oliva estas reacciones en cadena comienzan con la fricción de los frutos durante la molienda y la consecuente rotura de los tejidos vegetales, implicando la acción de enzimas y la aparición de compuestos volátiles. El posterior batido de la pasta de aceituna favorece la incorporación de estos aromas al aceite.

Es por tanto que, además de las características agronómicas de las aceitunas (variedad, estado de maduración, riego del fruto), las condiciones de extracción del aceite son una etapa clave en la actividad enzimática del proceso y en la posterior aparición de constituyentes volátiles durante la elaboración industrial de los aceites.

### II.5.3.- Contaminantes presentes en los aceites

No es muy habitual, pero puede darse el caso de que pequeñas cantidades de sustancias puedan ser encontradas en los aceites, ya sea por su contaminación durante el cultivo del olivo, en el transporte de la aceituna hasta la almazara o bien, en la etapa de extracción del aceite.

La existencia de metales en los aceites, tales como hierro y cobre, se puede deber al contacto del alimento con las partes metálicas del instrumental utilizado durante su extracción (molino de martillos, palas de la batidora, etc). Por lo general, el material utilizado a lo largo de todo este proceso debe estar fabricado en acero inoxidable, pero el desgaste, la mala limpieza de las partes y la falta de cuidados, origina que al entrar en contacto con la pasta de aceituna ésta se pueda contaminar.

El principal problema que origina la presencia de metales en los aceites está relacionado con la estabilidad. Los metales actúan como catalizadores favoreciendo reacciones de oxidación afectando además a las características organolépticas, por lo que provocan un descenso bastante considerable en la calidad del aceite.

Generalmente, la presencia de plaguicidas en los aceites es inusual, debido a que siguiendo las buenas de prácticas agrícolas y respetando los tiempos indicados por los fabricantes, los productos fitosanitarios son degradados o bien, son fácilmente eliminables con la acción de agentes externos. Sin embargo, sí que existen estudios (Amvrazi & Albanis, 2009) que muestran la presencia a muy bajas concentraciones (nivel de trazas) de determinados analitos, por ejemplo: fenthion, dimethoate o endosulfan. La presencia de estos compuestos se debe al uso inadecuado que se hace de los mismos. Por ello, es necesario seguir las recomendaciones durante todo el proceso, con el objetivo de respetar los límites máximos de residuos permitidos de cada sustancia y así evitar que supongan un riesgo potencial para la salud de los consumidores.

Otros tipos de contaminantes son los hidrocarburos. La contaminación se produce debido a la presencia de estas especies químicas en el medio ambiente, originadas durante las combustiones producidas por las industrias, la existencia de fuentes de contaminación potenciales como gasolineras o por contacto con disolventes industriales como pueden ser desechos de productos de pinturas, barnices y otros derivados.

#### II.5.4.- Determinación de contaminantes y constituyentes menores

Cada uno de los componentes estructurales del aceite de oliva, estén presentes en mayor o menor porcentaje, son importantes desde el punto de vista químico, y cuyo análisis es utilizado para caracterizar al aceite y detectar posibles fraudes. Así, existen una serie de ensayos químicos que son englobados en dos tipos diferentes de criterios: calidad y pureza. El primero de ellos, a grandes rasgos, pretende discernir entre las distintas categorías existentes dentro del propio aceite de oliva (virgen extra, virgen, refinado...). La segunda pretende distinguir mezclas con otros aceites de semillas. De igual manera, existe la necesidad de llevar un control sobre la existencia de posibles contaminantes en los aceites. La tabla II.5 engloba las distintas metodologías analíticas empleadas como criterios de calidad y pureza del aceite de oliva virgen.

---

Tabla II.5: Técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de aceites de oliva  
Fuente: (Quirantes et al., 2009)

criterio	Parámetro	Tipo de ensayo
Calidad	Acidez	Valoración ácido-base
	Índice de peróxidos	Valoración redox
	Absorbancia ( $\lambda=232$ y $270$ nm)	Espectrofotometría
	Impurezas insolubles en éter de petróleo	Diferencia de peso (Gravimetría)
	Humedad y materias volátiles	
Pureza	Ácidos grasos	GC-FID
	Ceras	
	Alcoholes alifáticos	
	Eritrodiol + uvaol	
	Estigmastadienos	
	Esteroles	
	Triglicéridos	HPLC
Contaminantes	<b>Plaguicidas</b>	<b>HPLC/GC-MS/MS</b>
	Disolventes halogenados	GC-ECD
	Benzopirenos	HPLC-FL
	Metales	Absorción atómica ICP-MS

Para la determinación de contaminantes orgánicos que puedan estar presentes en el aceite de oliva, entre ellos los plaguicidas, el análisis debe hacerse mediante técnicas cromatográficas utilizando espectrometría de masas como técnica de detección.

## II.6.- Plaguicidas utilizados en el cultivo del olivar y otros contaminantes

Debido a la creciente demanda de producción que se ha generado en el sector del olivar se ha visto la necesidad de aumentar las cosechas, así como los rendimientos de las mismas, por lo que distintos tipos de productos fitosanitarios y fertilizantes agroquímicos son utilizados para dicho fin. El uso de fertilizantes permite aumentar los nutrientes del cultivo y/o evitar el déficit de éstos. Los plaguicidas son utilizados para combatir el ataque de las plagas al fruto. Ambos, aplicados de manera incorrecta y en concentraciones elevadas, pueden acarrear efectos adversos, perjudiciales, e incluso ser tóxicos tanto para la misma planta como para otros seres vivos. Los residuos de estos compuestos constituyen un parámetro de calidad importante. Es por

ello que su uso debe de ser controlado con regularidad y las concentraciones aplicadas deberían mantenerse tan bajas como sea posible, con el fin de asegurar la protección del consumidor.

Otra serie de contaminantes orgánicos que se encuentran en el entorno, pueden llegar a ser nocivos en determinadas cantidades. Entre ellos hay que destacar los hidrocarburos aromáticos (monocíclicos y policíclicos). Su presencia en el medioambiente en los países desarrollados se debe principalmente a la industria y al uso de vehículos con motor. Gran parte de éstos se encuentran en el aire como consecuencia de combustiones incompletas.

### II.6.1.- Plaguicidas

Las sustancias activas que se han seleccionado para el desarrollo de esta tesis, son principalmente productos fitosanitarios comúnmente utilizados en el sector del olivar. Su empleo en agricultura se debe a su acción específica contra determinadas plagas o hierbas indeseables que actúan en perjuicio del desarrollo de la planta, dañando el fruto y, por consiguiente, afectando a la cosecha.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el término “plaguicida” como: “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, (FAO/OMS, 1999). La tabla II.6 muestra una clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su función.

Tabla II.6: Principales tipos de plaguicidas utilizados en la agricultura

Tipo	Acción específica
<b>Control de seres vivos invertebrados</b>	
Acaricida	Controlan ácaros que se alimentan de plantas
Insecticida	Acción contra los insectos
Molusquicidas	Combaten moluscos (babosas, caracoles...)
Nematicidas	Control de nematodos
<b>Control de seres vivos vertebrados</b>	
Atrayentes	Empleadas para la atracción de determinadas plagas
Avicidas	Combaten contra las aves
Piscicidas	Actúan sobre los peces
Repelentes	Usados para ahuyentar plagas no deseadas
Rodenticidas	Acción contra los roedores (ratas, topillos...)

Tipo	Acción específica
<b>Control de plantas</b>	
Defoliantes	Provocan la caída de la hoja
Desecantes	Se utilizan para secar los tejidos vivos de plantas
Herbicidas	Luchan contra las malas hierbas o adventicias
Reguladores	Aceleran o retardan el crecimiento de la planta
<b>Control de microorganismos</b>	
Alguicidas	Matan o ralentizan el crecimiento de algas
Bactericidas	Actúan contra las bacterias
Desinfectantes	Controlan gérmenes y microbios como bacterias o virus
Fungicidas	Combaten los hongos como el moho y verdín

Los plaguicidas también se pueden clasificar atendiendo a su naturaleza química. Se clasifican en dos tipos:

**a) Compuestos inorgánicos**, son complejos activos que carecen de carbono en su estructura. Su uso en agricultura es muy antiguo. Forman cristales en su estado natural y generalmente son solubles en agua. Suelen ser pocos específicos, no muy tóxicos para los insectos y por tanto se necesitan en grandes cantidades. Están compuestos por derivados de elementos básicos como azufre, boro, zinc, aluminio y cobre.

**b) Compuestos orgánicos**, poseen átomos de carbono en su estructura. La mayoría de ellos son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos. Suelen ser poco solubles en agua, además de tener baja velocidad de degradación y una elevada capacidad para bioacumularse y, por tanto, una mayor peligrosidad. Pueden estructurarse en distintas familias químicas, según sus grupos funcionales, que los caracterizan de propiedades comunes. Algunas de las familias más importantes se describen a continuación (Krieger, R. I. & Kireger, W. C., 2001).

**Organofosforados**, existen más de 200 compuestos pertenecientes a dicha familia que se utilizan principalmente como insecticidas y nematicidas. Son estructuras químicas, principalmente ésteres, amidas o tioles, derivadas del ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) (ver figura II.16). Poseen una alta toxicidad y baja estabilidad química. Son muy liposolubles y fácilmente hidrolizables. Entre los más importantes destacan: acephate, chlorpyrifos, diazinon, ethion, malathion, parathion y triclofon.

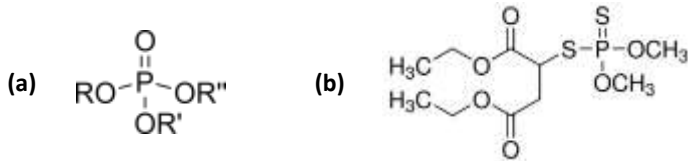


Figura II.16: (a) Estructura química general de la familia de los organofosforados; (b) estructura del Malathion ( $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ )

**Organoclorados**, están formados por hidrocarburos con una alta presencia de átomos de cloro en su estructura. Su origen se remonta a la síntesis del DDT (Diclorodifeniltricloroetano) utilizado durante muchos años como insecticida que actuaba sobre el sistema nervioso. Son compuestos que tienen una gran estabilidad química y una difícil degradación biológica además de ser propensos a bioacumularse en el tejido animal (Krieger, R. I. & Kireger, W. C., 2001). Su uso hoy en día está prohibido a nivel mundial, dado que están clasificados como carcinogénicos y mutagénicos. Un grupo muy importante en el olivar son los endosulfanes. Como ejemplo, en la figura II.17 se muestra la estructura del  $\alpha$ -endosulfan.

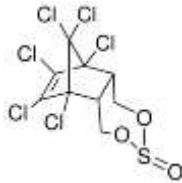


Figura II.17: Estructura química del  $\alpha$ -Endosulfan ( $C_9H_6Cl_6O_3S$ )

**Carbamatos**, son estructuras orgánicas sintetizadas a partir del ácido carbámico ( $NH_2COOH$ ) (ver figura II.18). Suelen ser ésteres y sales de éste, que se emplean como insecticidas debido a su efecto neurotóxico como inhibidores reversibles de la enzima colinesterasa. Son compuestos poco solubles en agua, por lo que quedan atrapados en las capas superficiales del suelo. Se degradan con relativa rapidez (Krieger, R. I. & Kireger, W. C., 2001). Algunos plaguicidas que pertenecen a esta familia son carbaryl, carbendazim, carbofuran o carbosulfan.

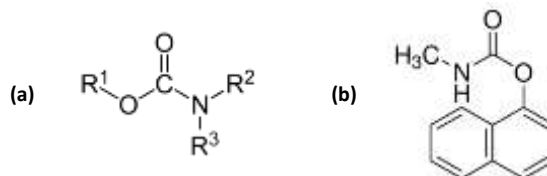


Figura II.18: (a) Estructura química general de los carbamatos; (b) estructura del Carbaryl ( $C_{12}H_{11}NO_2$ )

**Neonicotinoides**, al igual que todos los anteriores, el uso de estos compuestos se debe a su acción para combatir los insectos paralizándolos y provocando su muerte. Su estructura está basada en la nicotina ( $C_{10}H_{14}N_2$ ), formada por heterociclos, principalmente con átomos de nitrógeno en su composición, aunque también pueden presentar otros heteroátomos de azufre u oxígeno. Últimamente están siendo restringidos debido al efecto que causan sobre las abejas originando el colapso de colonias apícolas. Algunos de los más comunes son acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid y thiametoxam (ver figura II.19).

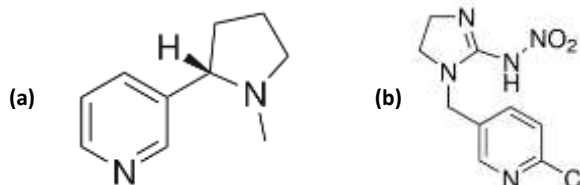


Figura II.19: (a) Estructura de la nicotina ( $C_{10}H_{14}N_2$ ); (b) Imidacloprid ( $C_9H_{10}ClN_5O_2$ )

**Triazinas**, dicha familia la componen derivados de la 1,3,5-triazina, anillo de seis miembros con tres heteroátomos de nitrógeno alternos en su estructura (ver figura II.20). Son empleados en los cultivos como herbicidas, debido a que actúan como limitadores de la fotosíntesis impidiendo el acceso al  $CO_2$  y deteniendo el funcionamiento de su mecanismo. No son muchas las estructuras derivadas de la triazina, alrededor de unas 14 especies son conocidas. Sin embargo, son sustancias peligrosas, fácilmente absorbidas por la piel y con una gran capacidad para acumularse (Krieger, R. I. & Kireger, W. C., 2001). Especialmente preocupante es su fácil lixiviación, que permite su filtración hasta las aguas subterráneas, cuya contaminación es bastante frecuente. Atrazine, simazine y terbuthylazine son algunos de los compuestos estudiados.

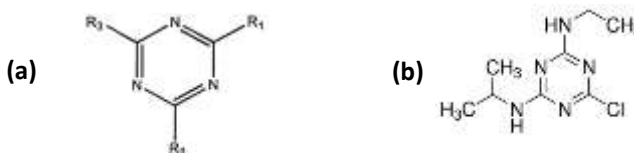


Figura II.20: (a) Estructura química general de las triazinas (1,3,5-triazine); (b) estructura de la atrazine ( $C_8H_{14}ClN_5$ )

**Triazoles**, al igual que las triazinas, este grupo de plaguicidas se utilizan para eliminar hierbas indeseables, actuando de manera similar a la anterior. Sus estructuras son derivadas del triazol, heterociclo de cinco miembros que posee tres átomos de nitrógeno en su estructura.

Algunos compuestos de los más representativos son difenoconazole, penconazole y tebuconazole (figura II.21).



Figura II.21: (a) Estructura general de un isómero del triazol, 1H-1,2,3-triazol ( $C_2H_3N_3$ ); (b) estructura del difenoconazol ( $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$ )

La gran mayoría de los analitos utilizados en esta tesis doctoral, pertenecen a algún grupo de las familias descritas anteriormente. De igual manera, algunos de ellos pueden ser clasificados en varias familias, a tenor de la variedad de grupos funcionales que puedan presentar sus estructuras.

#### II.6.2.- Otros contaminantes, BTEXS

Según la FAO (FAO/OMS, 1999), un contaminante es: “cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas las operaciones realizadas en agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetamiento, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de contaminación ambiental”.

Entre los contaminantes que puedan estar presentes en los alimentos se encuentran los hidrocarburos aromáticos monocíclicos (MAHs), ampliamente extendidos por el medio ambiente durante procesos naturales como incendios forestales o erupciones volcánicas, o también emitidos debido a la acción antropogénica. Un grupo representativo de ellos son los BTEXS (benceno, tolueno, etilbenceno, isómeros del xileno y estireno), generados por la combustión de combustibles fósiles y otros derivados del petróleo como son las gasolinas. La elevada peligrosidad que poseen unida a la fácil exposición de los cultivos a los mismos implican que una considerable cercanía a gasolineras o carreteras con alta concurrencia puedan ser definidas como posibles fuentes potenciales de contaminación. Las principales características de cada uno de ellos se detallan a continuación, («Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR)»):

**Benceno**, se encuentra comúnmente en el ambiente, derivado de los procesos industriales, estaciones de servicio de gasolina y escapes de automóviles. Otra de las fuentes de su presencia en el aire es el humo del tabaco, especialmente si es en el interior de las viviendas. La Agencia

para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) del Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (DHHS) así como la Agencia de Protección Ambiental norteamericana (EPA) han determinado que la exposición prolongada al benceno puede originar cáncer en los órganos que producen elementos de la sangre, desarrollando una leucemia mieloide aguda. Su estructura se muestra en la figura II.22.



Figura II.22: Estructura química del Benceno ( $C_6H_6$ )

**Tolueno**, es un hidrocarburo de origen industrial empleado en barnices, pinturas, lacas, cauchos e imprentas. Generalmente no permanece en el medio ambiente por mucho tiempo, ya que es degradado rápidamente por los microorganismos y transformado en otras sustancias. Por lo general, los niveles de tolueno en aire no superan  $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Sin embargo, y a diferencia del benceno, los estudios realizados en seres humanos y animales generalmente no determinan que sea un hidrocarburo carcinogénico. Su estructura química se compone de un anillo de benceno sustituido por un grupo metilo (figura II.23).

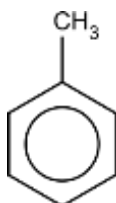


Figura II.23: Estructura química del Tolueno ( $C_7H_8$ )

**Etilbenceno**, es un componente natural del petróleo. La mayor parte de éste es utilizada para producir estireno, el resto forma parte de productos como pinturas, plaguicidas, barnices, residuos del tabaco y de la industria de automóviles. Su estructura se muestra en la figura II.24.

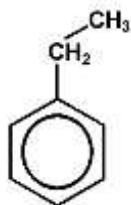


Figura II.24: Estructura química del Etilbenceno ( $C_8H_{10}$ )

**Xilenos (o-, m-, y p-)**, los tres isómeros del xileno son liberados al medio ambiente como consecuencia del almacenaje y transporte de los productos del petróleo. Por lo general, suelen entrar en contacto con el cuerpo por la respiración de vapores con xileno, o a través de la piel por el contacto directo. Se evaporan rápidamente. En el aire, es degradado por la acción de la radiación solar en unos dos días a sustancias menos perjudiciales. Concentraciones altas de xileno pueden causar retardo en el crecimiento desarrollo de los fetos, así como su muerte. La estructura del xileno consta de un anillo de benceno sustituido por dos grupos metilo dispuestos en posición orto-, meta- o para- (ver figura II.25).

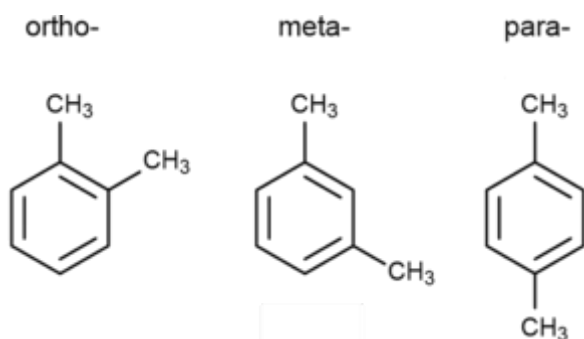


Figura II.25: Estructura química de los isómeros del Xileno (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>)

**Estireno**, este compuesto se utiliza principalmente en la manufactura de plásticos y caucho. También se encuentra en aquellos artículos que incluyen material aislante como fibra de vidrio, partes de automóviles y envases. El estireno puede localizarse en el aire, agua y suelo al ser liberado como residuo industrial. En el aire se degrada rápidamente en 1 o 2 días. En el agua y suelo el estireno es degradado por bacterias, no siendo acumulable en animales. Su estructura se muestra en la figura II.26.

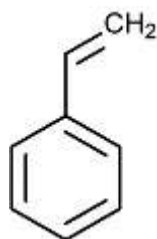


Figura II.26: Estructura química del Estireno (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>)

## **II.7.- Normativas sobre la presencia de plaguicidas y otros contaminantes en alimentos**

Debido al riesgo que suponen todos estos agentes tóxicos para la salud del consumidor, es de vital importancia controlar su modo de empleo, así como su presencia en los alimentos. Estos residuos de contaminantes químicos pueden llegar hasta el organismo por diversos mecanismos, por ejemplo, tener una exposición directa a concentraciones altas; o bien, aún a bajas concentraciones, pueden sufrir un proceso de bioacumulación en el organismo, pudiendo ocasionar problemas de salud a más largo plazo.

La presencia de residuos de plaguicidas y otros contaminantes en alimentos se debe al uso legal de los mismos en forma de preparados fitosanitarios durante su cultivo. Sin embargo, para evitar que residuos de éstos alcancen concentraciones peligrosas para la salud, es imprescindible seguir detenidamente las recomendaciones del fabricante (dosis utilizadas, frecuencia de uso, periodos de carencia y reingreso...), así como hacer un uso razonable de los mismos. Para ello, distintas instituciones a lo largo del mundo establecen criterios para su regulación, y no sólo de contaminantes o plaguicidas, sino también de posibles aditivos (como edulcorantes y colorantes) durante la elaboración del alimento (Directiva 89/107/CEE). Por ejemplo, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha creado el manual de buenas prácticas agrícolas (BPA), (FAO, COAG/2003/6) con el fin de que se realice un uso responsable de los productos fitosanitarios en aras de mantener la seguridad alimentaria y de promover un desarrollo sostenible en el cuidado de la biodiversidad y la preservación del medioambiente.

De manera análoga la Unión Europea (UE) establece normas cada vez más estrictas tanto a nivel de concentración, así como en el uso de fitosanitarios en determinadas zonas, como cerca de ríos, jardines, y otros lugares públicos. Además, la Comisión Europea en consenso con los estados miembros fija límites máximos de residuos de plaguicidas (MRL) en alimentos, de manera que aseguren un nivel lo suficientemente bajo como para no influir en la salud del consumidor. El cálculo de estos niveles se realiza teniendo en cuenta estudios experimentales de residuos de plaguicidas en los cultivos tras la aplicación de las buenas prácticas agrícolas, y el estudio sobre diferentes parámetros toxicológicos que puedan tener los plaguicidas. Entre éstos últimos se determina una dosis aguda de referencia (ARfD), una ingesta diaria admisible (IDA) y un nivel sin efecto observable (NOEL), (FAO, 2017). La primera de ellas (ARfD) hace referencia a la cantidad de sustancia presente en el alimento, en función del peso corporal, que una persona puede ingerir en un corto periodo de tiempo (un día o comida) sin provocar un riesgo en su salud. La Ingesta Diaria Admisible (IDA) se define como la cantidad de un compuesto químico que puede estar presente en un alimento y/o bebida, expresada en función del peso corporal, y

que puede ser ingerida diariamente durante toda la vida por una persona y sin que pueda ocasionar un riesgo sobre la salud del consumidor. Los niveles de IDAs son calculados a partir de experimentos con animales de laboratorio a los que se suministra la sustancia de estudio durante largos periodos de tiempo. Una vez analizadas las consecuencias en función de una curva dosis-respuesta, se establece un nivel de dosis sin efecto observable, lo que se denomina NOEL (*No Observed Effect Level*), al cual se le aplica un factor de seguridad (con valores de entre 100-1000) para su extrapolación a los humanos y posteriormente calcular la dosis admisible. Estos parámetros toxicológicos son calculados para todos los grupos de población, incluyendo aquellos con mayor vulnerabilidad, como pueden ser los bebés, los niños y los vegetarianos (FAO, 2017).

Tomando en consideración los valores toxicológicos para cada sustancia activa susceptible de ser peligrosa, y junto con estudios experimentales de los residuos encontrados tras la aplicación de los productos fitosanitarios según las buenas prácticas agrícolas (BPA), se establecen los límites máximos de residuos (MRLs). A pesar de ello, hay que tener en cuenta que la presencia conjunta de varias sustancias peligrosas puede originar efectos acumulativos y sinérgicos, por lo que no sólo habría que tener en cuenta los límites establecidos, sino que es recomendable la observación y extremar las precauciones en estos casos.

Los MRLs se establecieron mediante el Reglamento (CE) 396/2005, de obligado cumplimiento en todos los estados de la Unión (incluido España) bajo la premisa: “en aras de la libre circulación de mercancías, de la equidad de las condiciones de competencia entre los Estados miembros, así como de un nivel elevado de protección de los consumidores, es conveniente fijar a escala comunitaria los límites máximos de residuos (MRL) en productos de origen vegetal y animal, teniendo en cuenta las buenas prácticas agrícolas” (Reglamento (CE) 396/2005). Dicha norma actualmente vigente, deroga y unifica directivas previas tales como: la Directiva 76/895/CEE sobre fijación de contenidos máximos de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas; Directiva 86/362/CEE, en cereales; Directiva 86/363/CEE, en productos alimenticios de origen animal; Directiva 90/642/CEE, en productos de origen vegetal, y la Directiva 91/414/CEE, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, simplificando todo bajo un mismo y único acto legislativo.

Anualmente los MRLs estipulados para cada alimento son revisados, modificados, suprimidos o ampliados en función de los avances logrados hasta la fecha. Así, estos límites son catalogados en distintos anexos (I-VII) que son publicados en la norma, con el objetivo continuo de preservar un nivel elevado de protección para el consumidor y el entorno.

---

Es conveniente destacar que en los casos en que los usos autorizados de productos fitosanitarios no originen niveles detectables de residuos de plaguicidas, los MRL deben fijarse en el nivel más bajo de determinación analítica (límite de determinación). Para estos casos, se establece un valor por defecto en  $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para aquellos que no se hayan fijado MRL, (Reglamento (CE) 149/2008).

A nivel mundial, diferentes organismos estatales son los encargados de establecer leyes y normas similares a las de la UE en sus propios territorios. Por ejemplo, la EPA (*Environmental Protection Agency*) en EE.UU., es la que se encarga de su regulación. Otras instituciones relacionadas con el ámbito de la seguridad y protección del consumidor, utilizan recomendaciones para informar a los usuarios y hacerles llegar las normativas implantadas. Así, el *Codex Alimentarius*, la FAO, o la OMS, se encargan de la vigilancia y regulación del uso de los plaguicidas.

Los límites máximos de residuos de plaguicidas en aceituna, han sido publicados en los anexos actualizados periódicamente del Reglamento (CE) 396/2005, (se pueden consultar los MRLs en vigor en el anexo E de esta tesis). Sin embargo, para productos derivados como es el caso del aceite de oliva virgen, no existe un límite específico establecido. El anexo VI debería recoger factores de transformación o procesado a aplicar al MRL de la materia prima para obtener el MRL del producto procesado, pero dicho anexo sigue pendiente de publicación. Sin embargo, se ha hecho una primera aproximación al uso de factores de procesado en el reglamento que regula el control oficial de alimentos en la UE para comprobar el respeto a los MRLs.

Así, para los aceites de oliva vírgenes se propuso la utilización de un factor específico de transformación del aceite de 5 para el control oficial del trienio 2015-2017 (Reglamento (UE) 400/2014). Dicho factor se corresponde con un rendimiento graso estándar del aceite de oliva de un 20%. De esta forma al MRL correspondiente para cada plaguicida en aceituna, se le aplica el factor de preconcentración de 5, estableciendo un límite cinco veces más alto para el aceite de oliva que para el alimento sin procesar. Esta aproximación, tenía en cuenta un rendimiento teórico, a la vez que se asumía una transferencia completa (100%) del analito desde la aceituna hasta el aceite de oliva, hecho no necesariamente cierto para todos los casos, debido al diferente rango de propiedades químicas de todas las sustancias activas utilizadas. Las siguientes actualizaciones de la norma (Reglamento (UE) 2015/595) y el vigente Reglamento (UE) 2016/662 para el control oficial de MRLs en alimentos ya incluyen una modificación en la que distinguen el uso de un factor de 5 para las sustancias liposolubles y un factor de 1 para aquellas

que no lo son. Sin embargo, no se especifica un procedimiento estándar para incluir un plaguicida en uno de los dos grupos.

En cuanto a la presencia de otros contaminantes potencialmente presentes en el aceite de oliva (BTEXS) en productos alimenticios, no se encuentra regulación alguna en cuanto a niveles máximos permitidos. La única normativa vigente en España se corresponde con la presencia de benceno en agua apta para consumo estableciéndose en un valor de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a través del Real Decreto 140/2003.

## **II.8.- Métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas**

El desarrollo de metodologías analíticas para el análisis de plaguicidas en alimentos de alto contenido graso como son la aceituna y el aceite de oliva, es laborioso y de elevada complejidad. La principal dificultad estriba en el elevado porcentaje de grasa que presenta la matriz, además de la presencia de numerosos constituyentes de difícil aislamiento. Este hecho, implica un proceso de tratamiento de muestra previo que sea capaz de eliminar posibles coextractantes, a la vez que son imprescindibles otras etapas secundarias de purificación, con el objetivo de conseguir un extracto de la matriz lo más limpio posible.

Cuando se pretende desarrollar métodos multiresiduo para el análisis de compuestos con un amplio rango de polaridad, otro factor a tener en cuenta es la capacidad de la técnica para extraer una mayor cantidad de analitos en un mismo procedimiento. Esto puede ser un factor limitante dada la gran variedad de familias de plaguicidas y las diversas propiedades físico-químicas que poseen sus grupos funcionales.

### **II.8.1.- Métodos de extracción**

Entre las distintas técnicas utilizadas para la extracción de plaguicidas en alimentos de alto contenido graso destacan la cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) y la extracción en fase sólida (SPE), pudiendo ambas llevar una etapa preliminar de partición líquido-líquido con disolventes orgánicos, para simplificar los extractos y alargar la vida útil de las columnas (García-Reyes et al., 2007a).

La cromatografía de permeabilidad en gel (GPC), o cromatografía de exclusión por tamaño, permite la separación de las moléculas utilizando fases estacionarias de una porosidad

---

determinada. Los analitos en cuestión deben tener un tamaño más pequeño que los poros de la fase estacionaria a utilizar, de manera que atraviesen dichos poros, mientras el resto de interferentes de mayor tamaño (como los triglicéridos) son excluidos de dichos poros presentando tiempos de retención mayores. El uso de GPC como método de extracción posee, como principal ventaja, la rapidez y el grado de automatización del proceso. Sin embargo, el inconveniente más destacable es el hecho de que sea difícil conseguir una separación eficaz de analitos con bajo peso molecular, debido a su solapamiento parcial con la fracción de triglicéridos que constituye la parte grasa de la matriz. Esto implica que se deba alcanzar una solución de compromiso entre una limpieza del extracto aceptable, y unos porcentajes de recuperación óptimos para la mayoría de los plaguicidas.

Por el contrario, las técnicas basadas en el principio de extracción en fase sólida (SPE) consiguen obtener unos buenos resultados en cuanto al conjunto de recuperación de analitos-limpieza de extracto, por lo que surgen como alternativa a la GPC. Estos procedimientos incluyen metodologías algo más laboriosas, ya que introducen etapas de purificación y limpieza del extracto con sorbentes. La dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) se ha utilizado tanto para muestras de aceite de oliva como de aceituna, de forma que para aceite requiere de una extracción preliminar con disolventes (Ferrer et al., 2005). La técnica consiste en la dispersión del extracto de aceite o de la pasta de aceituna con aminopropil, transfiriendo la mezcla a un cartucho empacado con florisil (óxido de magnesio:sílice (85:15)).

Hoy en día el método más estandarizado y expandido para el análisis de plaguicidas en alimentos es el método de extracción QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Este método consiste en una extracción con acetonitrilo seguida de una etapa de purificación basada en un proceso de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) con amina primaria-secundaria (PSA) y sulfato de magnesio anhidro (AOAC Official Method, 2007). Para el caso particular de matrices con alto contenido graso, como el aceite de oliva y las aceitunas, se propuso una variante del método que incluía más sorbentes en la etapa de purificación, como C18, y carbón grafitizado (GCB), (Cunha, Lehotay, Mastovska, Fernandes, & Oliveira, 2007b). No obstante, a pesar de la alta eficacia del GCB para eliminar la grasa coextraída con los analitos de interés, presenta el inconveniente de que retiene a los plaguicidas con anillos planos en su estructura, por lo que no se puede utilizar el GCB como sorbente para estos analitos. Por otra parte, el método QuEChERS también presenta dificultades para extraer compuestos de alta polaridad, para los que se ha desarrollado una variante denominada QuPPe (EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, 2016) desarrollada por laboratorios de referencia europeos para el análisis de residuos de plaguicidas.

Los últimos progresos en cuanto a la mejora del tratamiento de muestra van encaminados sobre todo al uso de nuevos sorbentes de distinta naturaleza en la etapa de purificación (dSPE) como son: (Z-Sep/+, EMR-Lipid, MIPs, HLB, nanotubos de carbono...), que permitan mejorar las recuperaciones a la vez que conseguir extractos los más limpios posibles y disminuir los efectos de supresión de señal debido al efecto matriz. Como ejemplo, en la figura II.27 se muestra un diagrama del proceso de extracción QuEChERS utilizando el sorbente EMR-Lipid en la etapa de purificación del extracto.

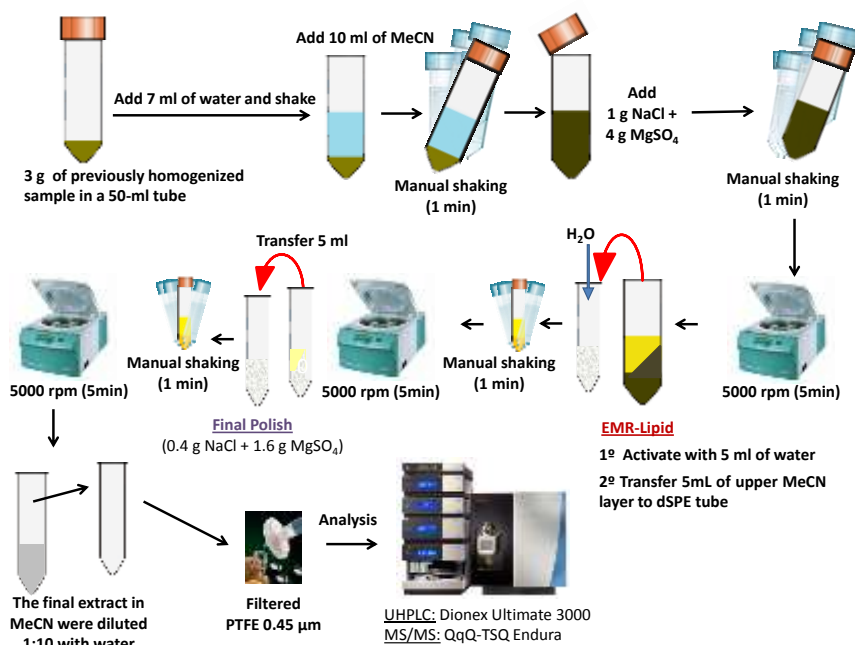


Figura II.27: Metodología para el tratamiento de muestra de aceite de oliva utilizando EMR-Lipid como sorbente

Otra técnica muy empleada y generalmente utilizada para el análisis de compuestos moderadamente volátiles en muestras de aceituna es la microextracción en fase sólida (SPME), que utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente. La fibra se encuentra encerrada dentro de un tubo, de tal manera que pueda retraerse o exponerse en presencia de la muestra. Así, los analitos quedan retenidos sobre su superficie (generalmente un recubrimiento polimérico) ya sea por su inmersión en la muestra o por equilibrio termodinámico con su espacio de cabeza (HS). Posteriormente, mediante desorción térmica los compuestos son separados de la fibra e introducidos en el cromatógrafo de gases.

### II.8.2.- Determinación de residuos de plaguicidas mediante técnicas acopladas a espectrometría de masas

Para la identificación y cuantificación de plaguicidas y otros contaminantes es necesario el uso de instrumentación que sea suficientemente sensible como para permitir la detección de niveles trazas, y la confirmación inequívoca de la presencia de estas sustancias en el alimento. A su vez, es imprescindible evitar la mayor cantidad de interferentes, ya no sólo con el objetivo de no dañar la instrumentación, sino también de impedir que posibles compuestos coextraídos enmascaren los compuestos de interés. Debido a la alta complejidad de las matrices de aceite de oliva y aceituna, la preparación de muestra vuelve a jugar un papel de vital importancia, con el fin de evitar falsos positivos, errores de sobreestimación y supresiones de señal. Por estas razones, tras la preparación de muestra actualmente se emplean técnicas híbridas, basadas en el acoplamiento cromatografía/espectrometría de masas, ya sea GC-MS o LC-MS. Estos dos acoplamientos proporcionan enormes ventajas en cuanto a la sensibilidad, capacidad cuantitativa y cualitativa, posibilidad de determinar especies que coeluyan, además de ser una técnica universal capaz de proporcionar información isotópica y estructural de forma rápida. La mayoría de estas propiedades ventajosas vienen de la mano de la espectrometría de masas, que es una herramienta analítica capaz de aislar los analitos de interés en función de su relación masa/carga, permitiendo su separación y posterior detección de forma muy eficaz y sensible. Un esquema general de los componentes de un espectrómetro de masas es descrito en la figura II.28, donde se pueden apreciar los tres componentes fundamentales de su instrumentación; una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector de iones.

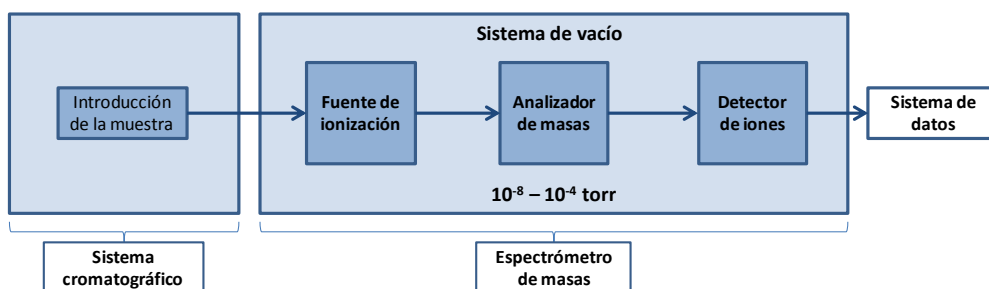


Figura II.28: Esquema instrumental de un espectrómetro y su acoplamiento con la cromatografía  
Fuente: (Cela, Lorenzo, & Casais, 2002)

A la hora de desarrollar métodos multiresiduo para un gran número de plaguicidas es importante agruparlos en función de la técnica de separación que vayamos a utilizar. Es decir, compuestos apolares y volátiles suelen ser determinados mediante cromatografía de gases (GC), mientras que aquellos analitos de polaridad media-alta, y de baja volatilidad, se determinan mediante cromatografía de líquidos (HPLC).

En las últimas dos décadas, los plaguicidas que se emplean suelen presentar grupos funcionales polares en sus estructuras, permitiendo así una degradación y eliminación más rápida, siendo por tanto más respetuosos con el medio ambiente que generaciones anteriores de plaguicidas, que presentaban mayor poder de bioacumulación y persistencia debido a su naturaleza apolar. Este cambio en la naturaleza química de los mismos ha propiciado un desarrollo mayor de las metodologías basadas en cromatografía de líquidos en detrimento de la cromatografía de gases (Alder, Greulich, Kempe, & Vieth, 2006). Dentro de la separación analítica mediante cromatografía líquida existen diferentes tipos de columnas capaces de abarcar un amplio rango de especies. Así, una columna rellena de una fase polar (como la sílice) permitiría la separación de compuestos polares, que serán eluidos de la misma con disolventes de naturaleza apolar, dando lugar a una cromatografía de fase normal. Por el contrario, se denomina cromatografía de fase inversa a aquella en la que los analitos se separan en una columna apolar mediante el uso de un eluyente de polaridad moderada. La cromatografía de fase inversa es la más utilizada para el análisis multiresiduo de plaguicidas, generalmente separados en columnas C8 y C18 con mezclas agua-acetonitrilo y agua-etanol como eluyentes. Recientemente se ha desarrollado la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), con unas columnas especiales que se utilizan para la separación de compuestos con una polaridad y solubilidad en agua elevadas (Nováková, Havlíková, & Vlčková, 2014). Este tipo de cromatografía suple las desventajas de la cromatografía en fase normal tradicional, que utilizaba a menudo disolventes tóxicos y halogenados, mientras que no permitía el uso de agua como eluyente por su capacidad para disolver la fase estacionaria de sílice. Finalmente, el desarrollo de columnas monolíticas, columnas de núcleo sólido (*core-shell*), o de tamaño de partícula reducido ( $< 2 \mu\text{m}$ ), ha propiciado el acortamiento de los métodos de análisis (Oláh, Fekete, Fekete, & Ganzler, 2010). La tendencia es a reducir los tiempos de análisis sin perder resolución, trabajando con flujos y presiones más altas en cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC).

#### II.8.2.1.- Fuentes de ionización

En un espectrómetro de masas, la fuente de ionización es el elemento encargado de llevar a cabo la transformación de la muestra, de forma que las especies neutras de la misma se convierten en especies cargadas en fase gaseosa, pudiendo así someterse al proceso de separación de partículas cargadas en condiciones de vacío del propio espectrómetro de masas. Existen una gran variedad de fuentes de ionización. El uso de un tipo u otro vendrá determinado por el estado de agregación inicial de la muestra. Esto, a su vez, viene condicionado por el sistema de introducción de muestra que se emplee, principalmente un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de líquidos. En el primer caso, la fuente de ionización más empleada es la de impacto electrónico, que no involucra un cambio de estado de agregación de la muestra, ya que

---

esta se introduce desde la salida de la columna sin ninguna alteración. Para especies más polares o térmicamente lábiles, se requiere el empleo de introducción de muestra líquida, mediante un cromatógrafo de líquidos de alta presión. En este caso, se suelen emplear fuentes de ionización a presión atmosférica, que no sólo provoquen la ionización de los analitos de interés, sino que también produzcan un cambio en el estado de agregación; la muestra inicialmente en estado líquido, debe pasar a fase gaseosa para poder ser compatible con las condiciones en el interior del espectrómetro de masas. En estos casos, las técnicas más empleadas son la técnica de electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI) (Hoffmann & Stroobant, 2007; Gros, 2004). La fuente de ionización ESI es la más utilizada debido al amplio rango de aplicabilidad que ofrece. Así, analitos que abarquen una gran variedad de polaridades y de pesos moleculares pueden ser ionizados mediante dicha técnica. La figura II.29 muestra un esquema general de los distintos tipos de fuentes utilizadas según la polaridad y el peso molecular de los analitos.

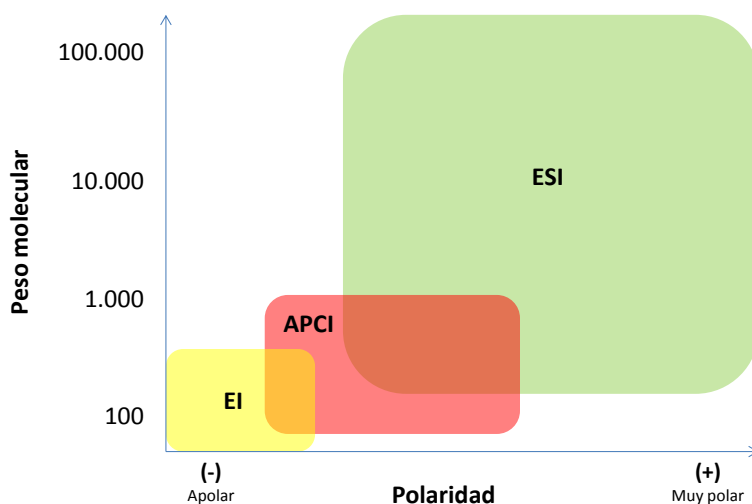


Figura II.29: Diagrama de distintas fuentes de ionización en función de su rango óptimo de utilidad

La fuente de ionización ESI (figura II.30) es la técnica más extendida actualmente en el análisis mediante HPLC-MS. Su fundamento consiste en la aplicación de una diferencia de potencial entre la aguja de nebulización y la entrada del espectrómetro de masas a presión atmosférica. Este campo eléctrico induce una acumulación de carga en la superficie de las gotas del aerosol de la fase móvil. Cuando la densidad de carga de las gotas alcanza un valor Raleigh ( $10^8 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) éstas sufren explosiones (de Coulomb) y se descomponen en gotas más pequeñas

que bajo la influencia de potenciales electrostáticos originan los iones moleculares (Hoffmann & Stroobant, 2007). Por otra parte, y según el tipo de fuente, gracias a una corriente de nitrógeno, se produce la desolvatación del disolvente, y, a la vez, una disminución del tamaño de las gotas y consecuentemente un aumento en la densidad de carga. La fuente ESI se considera como una fuente de ionización suave, es decir, que producen poca o ninguna fragmentación. Los espectros resultantes se corresponden con moléculas protonadas en modo positivo ( $[M+H]^+$ ) o desprotonadas, en modo negativo ( $[M-H]^-$ ).

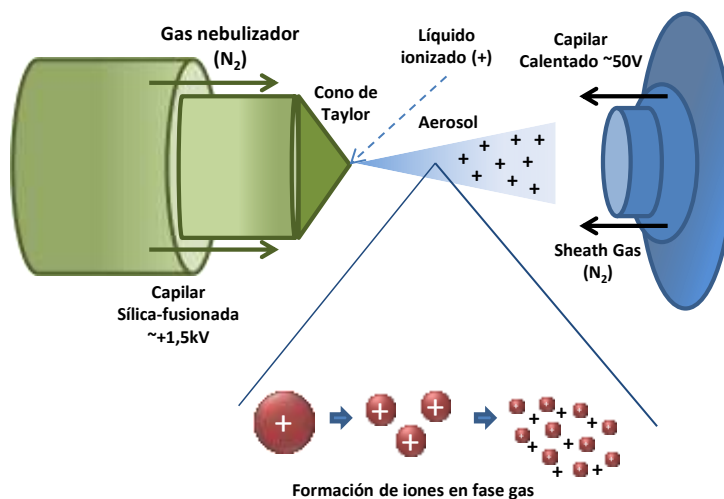


Figura II.30: Fuente de ionización electrospray

La ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric pressure chemical ionization*) es una técnica complementaria a la técnica ESI, especialmente útil para compuestos poco polares o que no presentan grupos fácilmente ionizables. El proceso es diferente a ESI, ya que en primer lugar se produce la evaporación del flujo de fase móvil y de los analitos mediante el empleo de un elemento evaporizador (bloque calentado a 350-450 °C), (Gros, 2004). Posteriormente, la muestra ya en fase gaseosa pasa por la proximidad de un electrodo con forma de aguja (aguja corona), que está sometida a un alto voltaje de corriente continua, generando un plasma por efecto corona. Este plasma produce la formación de especies (principalmente a partir de moléculas de la fase móvil) que tienen la capacidad de ionizar los analitos de la muestra a través de reacciones de transferencia de protones. En la actualidad, el uso de APCI está limitado a aplicaciones concretas como la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. En algunos equipos, existe la posibilidad de emplear fuentes de ionización multimodales que combinan los mecanismos ESI y APCI de forma simultánea, aunque ésta es una opción poco utilizada.

Los sistemas de ionización en cromatografía de gases son mucho más sencillos conceptualmente que en cromatografía de líquidos. La razón es que no es necesario evaporar fase móvil, simplemente el efluente de la columna cromatográfica (helio a un flujo de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) que contiene a los analitos en estado gaseoso debe ser sometido al proceso de ionización, sin mayor requerimiento que el sistema de vacío. Las dos fuentes de ionización más utilizadas en el acoplamiento cromatografía de gases/espectrometría de masas son las fuentes de impacto electrónico e ionización química. La fuente de impacto electrónico (EI, *Electron impact*) es la fuente más robusta, reproducible e universal. A diferencia de la fuente ESI, es una fuente dura, que da lugar a mucha fragmentación. Esta fragmentación es fácilmente reproducible entre equipos de diferentes configuraciones por lo que es sencillo el desarrollo de bases de datos universales como la NIST. El proceso de ionización está basado en la colisión de moléculas neutras con un haz de electrones, dando lugar al arranque de un electrón de la molécula y también a la fragmentación de la misma. Los electrones empleados son emitidos a través de un filamento caliente de wolframio o renio y se aceleran mediante un potencial de 70 eV existente entre el filamento y el ánodo. Las trayectorias de los electrones y las moléculas son perpendiculares, cruzándose en el centro de la fuente, donde colisionan. En el choque, los electrones transfieren parte de su energía cinética a la molécula produciendo su ionización acompañada de un exceso de energía de no más de 60 eV. La ionización por impacto electrónico se da en modo de ionización positivo.

La ionización química es mucho menos común en cromatografía de gases. En este caso, las colisiones de las moléculas neutras de la fase gaseosa se producen con especies reactivas en fase gaseosa formadas por el empleo de un gas reactivo. Para llevar a cabo el proceso de ionización química, se introduce un gas en la región de ionización manteniéndose a presión aproximada de 1 torr, en una cantidad tal que la relación de concentración entre el reactivo y la muestra sea de  $10^3$ - $10^4$ . Normalmente se obtienen iones positivos, aunque la ionización química de 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 menos fragmentación) que los espectros de impacto de electrones. Recientemente, se está popularizando el empleo de fuentes de ionización química a presión atmosférica para cromatografía de gases, que permiten obtener espectros con poca fragmentación para así poder determinar con facilidad el peso molecular de las especies de interés, así como la composición elemental si se dispone de espectrometría de masas de alta resolución (Nácher-Mestre et al, 2014).

### II.8.2.2.- Analizadores de masas:

Una vez que la muestra ha sido ionizada, las especies formadas son guiadas mediante un sistema de enfoque con una serie de elementos electrónicos que tienen como propósito minimizar la pérdida de iones durante el transporte hacia el analizador de masas. La función principal del analizador es separar los iones producidos, en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Son varios los tipos de analizadores que existen, los cuales realizan la separación de iones en función de distintos principios. Según su diseño, los analizadores ofrecerán distintas resoluciones (precisión decimal en la separación de las masas) y sensibilidades frente a la concentración de los analitos estudiados (Hoffmann & Stroobant, 2007; Gros, 2004). Podemos distinguir entre dos tipos de espectrometría de masas en función del equipo utilizado: espectrometría de masas de baja resolución, que proporciona resultados de masa nominal, y espectrometría de masas de alta resolución, que proporciona resultados de masa exacta (cuatro o cinco decimales).

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, *High Resolution Mass Spectrometry*) proporciona valores de masas de manera exacta y una elevada sensibilidad y selectividad para el modo de trabajo de adquisición de espectro completo o *full scan*. Puede ser utilizada para el análisis tanto de compuestos conocidos, así como de desconocidos. La espectrometría de masas de baja resolución se suele utilizar en modo tándem (MS/MS), mediante el uso de analizadores de iones capaces de realizar el aislamiento y fragmentación de los iones en su interior (como las trampas de iones), o bien mediante el uso de instrumentos híbridos que combinen varios analizadores de masas (Ej: espectrómetros de masas de triple cuadrupolo). El modo MS/MS se emplea con el objetivo de aumentar la selectividad y sensibilidad, así como para permitir la identificación, cuantificación y confirmación inequívoca de las moléculas de interés, a través de diferentes experimentos que permitan obtener información de utilidad basada en la fragmentación controlada de las moléculas de analito y la obtención de iones fragmento. Los espectrómetros de masas de alta resolución también se pueden utilizar en modo MS/MS, mediante el uso de equipos híbridos capaces de proporcionar fragmentos con masa exacta; estos equipos se suelen utilizar en las técnicas "ómicas" por la cantidad de información que pueden proporcionar.

Los analizadores de masas de baja resolución son el analizador de cuadrupolo (Q) y las trampas de iones, tanto cuadrupolar (IT) como lineal (LIT). Los analizadores de alta resolución son el de sector magnético, el de tiempo de vuelo (TOF), el de resonancia ciclotrónica de iones (ICR) y el orbitrap. De los diferentes analizadores y configuraciones de equipos híbridos que existen en el mercado, a continuación se describen algunos de los más comunes, que han sido

---

empleados en esta tesis doctoral: triple cuadrupolo, trampa de iones y analizador de tiempo de vuelo.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) es un equipo compuesto por dos cuadrupolos que actúan como filtro de iones, y una celda de colisión, situada entre ambos cuadrupolos, encargada de fragmentar los analitos de interés. El proceso de disociación (*collision induced dissociation (CID)*) es realizado por un gas de colisión, cuya presión se modula dentro de la celda de colisión, dando lugar a la fragmentación de las mismas. Los fragmentos originados son guiados hasta el último cuadrupolo donde serán filtrados en función de su relación masa/carga. Esta configuración es muy empleada y permite una gran variedad de modos de adquisición. En las figuras II.31 y II.32 se muestran los espectrómetros de masas utilizados en esta tesis doctoral, acoplados a GC y LC, respectivamente.

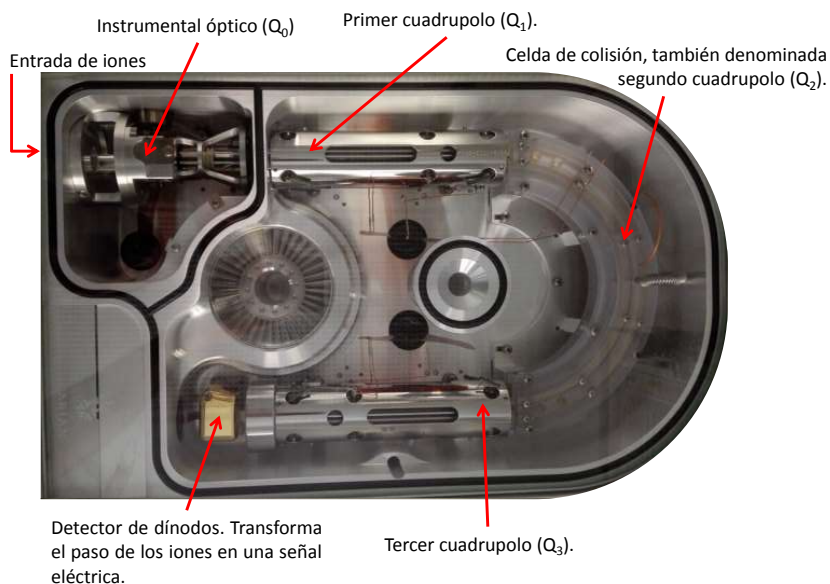


Figura II.31: Vista del instrumental que compone un analizador de masas de triple cuadrupolo (QqQ)



Figura II.32: Equipo LC-Qq utilizado. Cromatógrafo de líquidos Dionex Ultimate 3000 acoplado a un espectrómetro TSQ-Quantiva triple cuadrupolo (*Thermo Scientific*)

La trampa de iones (IT, *Ion Trap*) es una variante del analizador de cuadrupolo que presenta la posibilidad de ejecutar experimentos de aislamiento de iones y de fragmentación en el mismo espacio físico. Esto permite llevar a cabo sucesivos experimentos MS/MS ( $MS^n$ ) que posibilitan el seguimiento del patrón de fragmentación de los compuestos, lo que facilita los estudios de elucidación estructural de moléculas desconocidas. Este analizador tiene menos utilidad que el analizador de triple cuadrupolo para aplicaciones cuantitativas, siendo uno de los motivos principales su menor rango lineal debido a efectos especio-carga entre los iones atrapados en el analizador.



Figura II.33: Instrumento GC-IT. Cromatógrafo Focus GC acoplado a una trampa Polaris Q (*Thermo Scientific*). Recurso de los servicios técnicos de instrumentación (CICT, Universidad de Jaén).

En el analizador de tiempo de vuelo (*TOF, Time of flight*), los iones generados en la fuente de ionización son acelerados al aplicarse un voltaje de idéntica magnitud para todos los analitos. Estos iones acelerados, atravesarán una región libre de campos eléctricos y magnéticos (tubos de vuelo), que suele estar situada perpendicularmente a la fuente de iones y llegarán a un detector. El tiempo que tardan en recorrer ese tubo de vuelo será inversamente proporcional a los valores masa/carga de los iones. Este tipo de analizador, al ser de alta resolución, permite la obtención de masas exactas de iones con hasta cuatro cifras decimales. Dentro del campo de aplicación del análisis de residuos de plaguicidas, estos analizadores han sido utilizados para la creación de bases de datos de masa exacta de plaguicidas para su identificación automática en muestras reales.



Figura II. 34: Equipo LC-TOF. Cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 acoplado a un espectrómetro de tiempo de vuelo Agilent 6220 (*Agilent Technologies*)

### Modos de adquisición

Dependiendo del tipo de instrumentación que se utilice (espectrómetros de masas sencillos o en tándem), existen diferentes modos de trabajo o de adquisición. Para los espectrómetros de masas sencillos, éstos pueden actuar en modo de adquisición de espectro completo o *full scan* o en modo de monitorización selectiva de iones (*Selected Ion Monitoring (SIM)*). El primer modo

proporciona información de la muestra en conjunto y de todas sus especies, aunque, en detrimento de la sensibilidad, según el tipo de analizador que se emplee. El modo SIM se suele usar en analizadores de cuadrupolo sencillo, particularmente en GC-MS. Los espectrómetros de masas híbridos, surgen de la combinación de varios analizadores sencillos, lo que permite un abanico de modos de trabajo mucho más versátil y completo. A modo de ejemplo, se muestra los modos de adquisición de un equipo de triple cuadrupolo (QqQ), cuyas combinaciones originan hasta 4 posibilidades para la identificación de los analitos (ver tabla II.7), las cuales se describen a continuación.

Tabla II.7: Modos de trabajo MS-MS en función de las configuraciones de trabajo de los distintos cuadrupolos

Modos de trabajo	Configuración Q <sub>1</sub>	Configuración Q <sub>3</sub>
Barrido de iones producto ( <i>Product Ion Scan (PIS)</i> )	SIM iones precursores	<i>Full Scan</i>
Monitorización simultánea de transiciones MS/MS ( <i>Multiple Reaction Monitoring (MRM)</i> )	SIM iones precursores	SIM iones fragmento
Barrido de pérdidas neutras ( <i>Constant neutral loss</i> )	<i>Full Scan</i>	<i>Full Scan</i>
Barrido de iones precursores ( <i>Precursor ion scan</i> )	<i>Full Scan</i>	SIM iones fragmento

En el modo de adquisición de barrido de iones producto (*Product-Ion Scan (PIS)*): El primer cuadrupolo (Q<sub>1</sub>) selecciona un ion de interés (ion precursor) que es enviado hasta la celda de colisión (generalmente denominada Q<sub>2</sub>) donde los iones son fragmentados mediante el empleo de un gas de colisión (CID). Los iones fragmento (iones producto) son enviados hasta el tercer cuadrupolo (Q<sub>3</sub>) que opera en modo *full scan* y donde simplemente los iones serán separados en función de su masa/carga. Con este modo de trabajo se obtienen los espectros de fragmentación de las especies de interés (ver figura II.35).

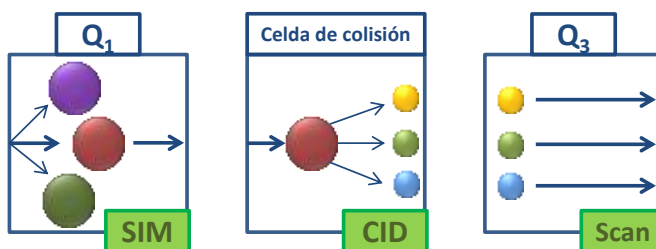


Figura II.35: Esquema del modo de trabajo barrido de iones producto (PIS)

En el modo de monitorización simultánea de transiciones MS/MS (*Multiple Reaction Monitoring (MRM)*): Se selecciona un ion precursor en el primer cuadrupolo, que será fragmentado en la celda de colisión y posteriormente de entre todos los fragmentos característicos de cada compuesto, un número limitado (generalmente dos) serán seleccionados por el Q<sub>3</sub> y su señal será registrada en el detector (figura II.36).

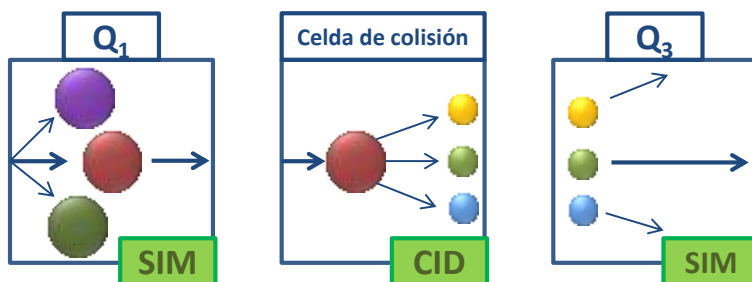


Figura II.36: Esquema del modo de trabajo de monitorización simultánea de transiciones MS/MS (MRM)

En el barrido de pérdidas neutras (*Constant Neutral Loss*) los cuadrupolos Q<sub>1</sub> y Q<sub>3</sub> operan en modo de trabajo *full scan*. Todos los iones pasan hasta la celda de colisión donde son fragmentados y posteriormente registrados por el último cuadrupolo (ver figura II.37). Los cuadrupolos Q<sub>1</sub> y Q<sub>3</sub> están sincronizados de forma que se mide una diferencia de masa/carga constante entre ambos cuadrupolos para cada tiempo. Este modo de trabajo se utiliza principalmente para el análisis de familias de compuestos que pierden fragmentos característicos y comunes.

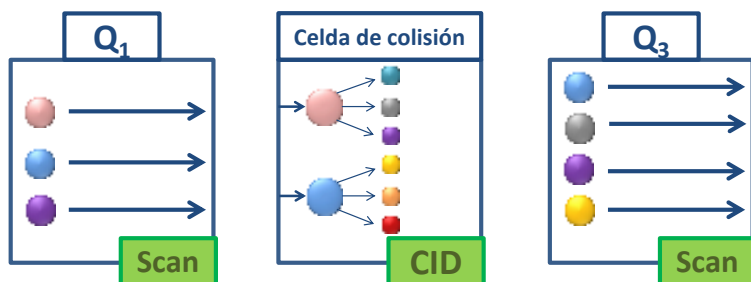


Figura II.37: Esquema del modo de trabajo barrido de pérdidas neutras (*Constant neutral loss*)

En el barrido de iones precursores (*Precursor-Ion Scan*), el  $Q_3$  opera en modo SIM, fijando la masa del fragmento de interés, mientras que el primer cuadrupolo realiza un barrido de iones, que van pasando a la celda de colisión, donde una vez fragmentados son dirigidos hasta el  $Q_3$ , que sólo filtrará la masa del fragmento de interés. Este modo de trabajar se utiliza para la identificación de los iones precursores, generalmente pertenecientes a la misma familia, que presentan grupo funcional o estructura común (figura II.38).

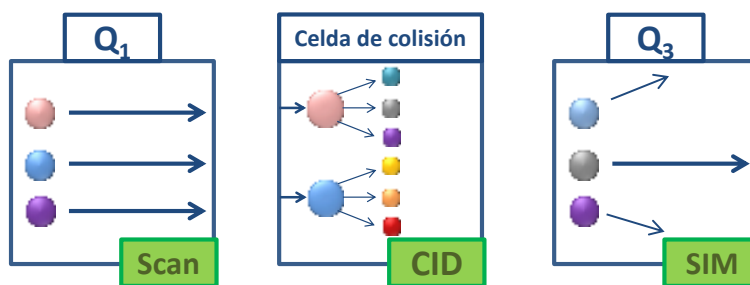


Figura II.38: Esquema del modo de trabajo barrido de iones precursores (*Precursor-Ion Scan*)

### II.8.3.- Criterios para la identificación de iones en espectrometría de masas

A la hora de realizar la identificación de los analitos y la confirmación de los resultados es obligatorio seguir las recomendaciones (SANTE/11945/2015 y Directiva 2002/657/CE) que establecen unos criterios mínimos para la identificación de compuestos cuando se analizan mediante espectrometría de masas. La Comisión Europea ha establecido guías para el control de la calidad y los procedimientos a utilizar en el caso de la validación de métodos para análisis de residuos de plaguicidas en alimentos (SANTE/11945/2015). Esta guía proporciona información detallada sobre diferentes criterios tanto cromatográficos como de espectrometría de masas. Estos criterios incluyen la coincidencia del tiempo de retención con respecto del patrón de la sustancia a confirmar, o la comparación de los espectros de masas, bien a través de medidas de masas exactas con unas tolerancias requeridas, o a través de las abundancias relativas de los iones producto característicos cuando se trate de la identificación mediante espectrometría de masas en tándem. Estos criterios están basados en la Directiva 2002/657/CE (destinada a la identificación de productos veterinarios en matrices de origen animal) que fue pionera en cuanto al establecimiento de diferencias entre la fiabilidad de los diferentes modos de adquisición en espectrometría de masas, a través del empleo de los *puntos de identificación* (Directiva 2002/657/CE). La tabla II.8 muestra un resumen de los criterios establecidos en la guía SANTE/11945/2015.

Tabla II. 8: Requisitos de la guía SANTE para la identificación de analitos

Características del detector MS	Ejemplos MS típicos	Adquisición	Requerimientos para la identificación	
			Nº Mínimo de iones	Otro
Unidad resolución de masas	Q sencillo, IT, TOF	<i>Full scan</i> , limitado en rango m/z, SIM	3 iones	S/N ≤ 3  Picos cromatográficos del ión extraído deben solara por completo  Ratio ≤ 30% de la media de los patrones de calibración de la misma secuencia
MS-MS	QqQ, IT, Q-Trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	SRM, MRM	2 iones producto	
Medida precisa de masas	Alta Resolución (HRMS): Q-TOF, Q-Orbitrap, FT-ICR-MS, Sector magnético	<i>Full scan</i> , limitado en rango m/z, SIM, fragmentación con o sin ion precursor o combinación de ellas  Combinación MS y MS-MS con resolución de masas para el ion precursor aislado	2 iones con precisión de masas ≤ 5ppm  <u>2 iones:</u> 1 ion molecular o aducto con precisión de masas ≤ 5ppm  <u>Además:</u> 1 ion MS-MS producto	

#### II.8.4.- Antecedentes en la determinación de residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos en aceite de oliva y aceitunas

Las metodologías analíticas para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos de alto contenido graso han experimentado un gran avance en los últimos años. Actualmente, el análisis se lleva a cabo mediante el acoplamiento de técnicas cromatográficas y la espectrometría de masas como sistema de detección, lo que ha propiciado una mejora significativa en la calidad de la identificación y en la sensibilidad de la determinación de los analitos. Por lo que respecta a la etapa de tratamiento de muestra, se han propuesto diferentes aproximaciones para la extracción de plaguicidas en matrices grasas. Técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME), (Kataoka, Lord, & Pawliszyn, 2000), la cromatografía de permeabilidad sobre geles (GPC), (Patel, Fussell, Hetmanski, Goodall, & Keely, 2005; Fernández Moreno, Arrebola Liébanas, Garrido Frenich, & Martínez Vidal, 2006; García Sánchez, Ramos Martos, & Ballesteros, 2006), la dispersión en fase sólida en matriz (MSPD), (Ferrer et al., 2005; Cunha, Fernandes, Beatriz, & Oliveira, 2007a; Gilbert-López, García-Reyes, Fernández-Alba, & Molina-Díaz, 2010a; Zhan et al., 2016), y la extracción en fase sólida (SPE) en cartucho, (Garrido Frenich, Martínez Vidal, Pastor-Montoro, & Romero-González, 2008; Avramides, 2006), han ido cayendo en desuso a favor de la metodología QuEChERS (AOAC Official Method, 2007). La principal ventaja de este

procedimiento es la sencillez, el empleo de materiales desechables de bajo coste y la eficacia para el análisis multirresiduo. Dicha estrategia auna varias etapas complementarias, en concreto, una extracción líquido-líquido seguida de una etapa de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Esta última etapa es la que ha tenido más evolución en los últimos años, ya que con la continua mejora introducida por nuevos sorbentes específicos para la eliminación de coeluyentes grasos, se ha mejorado la limpieza de los extractos finales con las ventajas asociadas con la minimización de los efectos matriz. Los sorbentes más utilizados para el análisis de matrices grasas son: amina primaria secundaria (PSA), C18 y carbón grafitizado (GCB), (Anagnostopoulos & Miliadis, 2013; Polgár, Kmellár, García-Reyes, & Fodor, 2012; Chamkasem, Ollis, Harmon, Lee, & Mercer, 2013), otros más novedosos basados en sílica funcionalizada con óxido de zirconio (Z-Sep/+), (Rajski, Lozano, Uclés, Ferrer, & Fernández-Alba, 2013; Moreno-González, Huertas-Pérez, García-Campaña, & Gámiz-Gracia, 2014; Lozano et al., 2014; Lu et al., 2015; Nieto-García, Romero-González, & Garrido Frenich, 2015), y de más reciente aparición el Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid), el cual ha sido aplicado en esta tesis doctoral (López-Blanco et al., 2016a).

El tipo de cromatografía empleada para el análisis varía en función de las características de los plaguicidas a analizar. Así, para analitos volátiles y apolares se suele utilizar GC-MS/MS (Amvrazi & Albanis, 2006; Aramendía et al., 2007), mientras que para compuestos polares y térmicamente lábiles se suele emplear LC-MS/MS, (Annastasiades, Lehotay, Stajnbaher, & Schenck, 2003; Cunha et al., 2007b; Lehotay et al., 2010; Gilbert-López, García-Reyes, Lozano, Fernández-Alba, & Molina-Díaz, 2010b; Polgár et al., 2012). Con respecto a especies altamente hidrofílicas como los herbicidas diquat y paraquat empleados en el olivar, hasta ahora se utilizaban columnas de fase reversa (C18) y formación de pares iónicos mediante la adición de aditivos a la fase móvil para conseguir la retención de compuestos con mayor polaridad (Aramendía et al., 2006). Como alternativa para mejorar el proceso de separación de los analitos sin tener que emplear pares iónicos, recientemente se ha propuesto el empleo de columnas de interacción hidrofílica (HILIC), que permiten una separación muy satisfactoria de contaminantes polares (Vass et al., 2016; Van Nuijs, Tarcomnicu, & Covaci, 2011; Esparza, Moyano, & Galceran, 2009).

Por lo que respecta a la etapa de detección, la evolución en el uso de espectrómetros de masas más sensibles y selectivos ha ido en progresión con respecto a los avances realizados en la preparación de muestra. Así, hace unos años eran empleados analizadores de baja resolución (Ferrer et al., 2005; Cunha et al., 2007b), mientras que hoy en día el uso de la espectrometría masas en tándem es bastante más frecuente mediante el empleo de triples cuadrupolos o trampas iónicas (Anagnostopoulos & Miliadis, 2013; Moreno-González et al., 2014).

---

El avance realizado en todos estos ámbitos permite una mejora considerable en el análisis de muestras reales, y por tanto los límites de detección y cuantificación son los suficientemente bajos como para la detección de sustancias que puedan estar presentes en los alimentos a nivel de trazas. Así, estudios sobre muestras comerciales de aceites de oliva en Grecia (Amvrazi & Albanis, 2009) han detectado la presencia de una notable cantidad de plaguicidas como son dimethoate, fenthion, clorpyrifos, ethion, endosulfan y methidathion por nombrar algunos, en un rango de concentraciones  $\leq 50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Otra ventaja que aporta el empleo de instrumentación más sensible es que se pueden simplificar algunas etapas de tratamiento de muestra (etapas de limpieza y etapas de evaporación y redisolución) que involucran una pérdida parcial de analitos, sustituyéndose por diluciones del extracto con la composición de la fase móvil inicial. Esto simplifica los extractos, evita efectos matriz y alarga los periodos de uso del equipo sin necesidad de limpiar la fuente de ionización.

En cuanto al control de plaguicidas en el olivar, como se ha detallado en el apartado II.7 de esta tesis, la Unión Europea establece unas concentraciones límite (MRLs) que pueden tolerarse en aceituna para producción de aceite o aceituna de mesa (Reglamento (CE) 396/2005). Sin embargo, no existen límites máximos de residuos para aceite de oliva. El Anexo VI, aún por desarrollar, debe establecer los denominados factores de procesado que permitan transformar los MRLs de la materia prima en los MRLs de los productos procesados. Mientras tanto, para establecer los MRLs que permitan el control de residuos de plaguicidas en aceite de oliva, se aplica un factor por defecto de 5 para sustancias liposolubles, sobre los valores establecidos en aceituna (Reglamento (UE) 2016/662). Para aquellas sustancias que no son liposolubles el factor por defecto a aplicar es de 1. El único estudio relativo al cálculo de factores de procesado en aceite de oliva (Amvrazi & Albanis, 2008), está orientado al cálculo de estos factores conforme se modifican las condiciones de extracción del aceite de oliva durante su producción (como es el caso de la adición de agua), con la idea de eliminar los plaguicidas durante la producción de aceite de oliva.

Estudios similares sobre el cálculo de factores de procesado sí que se han realizado aplicados a otro tipo de matrices vegetales como son: tomate (Abou-Arab, 1999; Liu et al., 2014); pepino, (Ramezani & Shahriari, 2015); espinaca, (Bonnechère et al., 2012); manzana, (Li, M. et al., 2015; Martin et al., 2013); pasa, (Shabeer et al., 2015); o naranja, (Li, Y. et al., 2012); y en cereales tipo soja (Zhao, Ge, Liu, & Jiang, 2014) y sorgo (Han et al., 2016). Aun así, estos estudios están limitados a un reducido número de analitos o, principalmente, ver cómo afectan el uso de etapas adicionales en el procesado, como son secado, lavado o molturación (Keikothaile, Spanoghe, & Steurbaut, 2010). El estudio de los factores de procesado durante la producción de aceite de

oliva es por tanto de gran interés para poder explorar el comportamiento y efecto de concentración de los plaguicidas en dicho proceso en la almazara.

## **II.9.- Métodos analíticos para la determinación de BTEXS**

### II.9.1.- Técnicas de espacio de cabeza para la determinación de compuestos volátiles

La técnica de espacio de cabeza (HS) es un procedimiento de introducción de muestra, por lo general en un sistema cromatográfico, de manera que pueda ser analizada. Sin embargo, dicha técnica posee un rango de aplicaciones más amplio y, puesto que se basan en la separación de una fase gas respecto a otra líquida o sólida, puede ser estudiada conjuntamente con las técnicas de destilación y evaporación.

Es una modalidad muy limpia pues se utiliza para la determinación de los componentes volátiles existentes en una muestra ya sea sólida o líquida, de manera que evita la acumulación de aquellos componentes que no son volátiles en el cromatógrafo de gases. Para su análisis se introduce la muestra en un vial de vidrio cerrado por un tapón perforado y sellado con un septum. A continuación, el espacio vacío puede llenarse con un gas inerte y presurizarse a un valor constante. Posteriormente se calienta el vial en un horno a una temperatura determinada, de manera que se produzca la evaporación de los componentes volátiles. Así pues, se genera una fase gaseosa en el espacio de cabeza del vial, rica en los componentes volátiles a determinar y que se encuentra en equilibrio termodinámico con la fase sólida o líquida.

Existen varios métodos de separación del espacio de cabeza, que puede ser estático, dinámico o mediante microextracción en fase sólida, (Cela et al., 2002):

El método estático es el más simple y el que se va a utilizar a lo largo de esta tesis. Una vez aumenta la temperatura del vial, se deja transcurrir un periodo de equilibrio termodinámico entre las fases presentes (entre 30 min y 1 h). En estas condiciones, la cantidad existente de cada compuesto volátil en el volumen de espacio de cabeza es proporcional a su concentración en la matriz. Una vez alcanzado el equilibrio, los analitos a determinar son introducidos en el inyector del cromatógrafo de gases.

En el método dinámico, 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. El proceso de purga se realiza esencialmente en la fase dinámica de la extracción de los componentes mediante el paso de una corriente de gas inerte burbujeado a través de la muestra. Así pues, de esta manera se incrementa la interfase líquido-gas. La

---

principal desventaja que presenta esta técnica, es que los interferentes volátiles también son preconcentrados al mismo tiempo que los analitos. Para salvar dicho obstáculo, se intercala en la corriente gaseosa de salida un sistema de atrapamiento de los solutos de interés, generalmente es un cartucho de polímero o material adsorbente o un sistema de críoatrapamiento, o incluso ambos. Posteriormente, los analitos son transferidos directamente hacia el cromatógrafo de gases mediante desorción térmica.

**HS-SPME** (*Head space solid phase microextraction*): La microextracción en fase sólida utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un adsorbente, generalmente formado por un recubrimiento polimérico, utilizado para compuestos orgánicos y/o inorgánicos volátiles. La fibra se encuentra en el interior, quedando expuesta a la muestra. Esta técnica consta de dos etapas:

1) Etapa de extracción: Los analitos se retienen en la fase estacionaria mediante procesos de adsorción y desorción, los cuales se llevan a cabo manteniendo la fibra en el espacio de cabeza que se encuentra en equilibrio con la disolución.

2) Etapa de desorción: La cual se puede realizar térmicamente en el inyector del cromatógrafo de gases o bien, utilizando disolventes orgánicos de forma manual, o mediante un cromatógrafo de líquidos.

#### II.9.2.- Acoplamiento a la cromatografía de gases: modos de trabajo

La cromatografía de gases es la técnica idónea para el estudio de hidrocarburos aromáticos como son el caso de los BTEXS, debido a la facilidad que tienen para volatilizarse e introducirse en la columna cromatográfica. La muestra se introduce en el inyector perforando el septum mediante una jeringa, bien de forma manual o mediante un sistema automático. Si la muestra es inyectada en forma líquida (disuelta en un disolvente volátil, como por ejemplo hexano) es volatilizada en el inyector debido a la alta temperatura, y si ya es inyectada en forma gaseosa (como es el caso del método de espacio de cabeza), se mantiene gaseosa gracias a la alta temperatura.

Cuando se trabaja con microextracción en fase sólida, la fibra se inserta en el inyector durante varios minutos para que los analitos se desorban de la fibra por efecto de la temperatura y queden en fase gaseosa. Una vez que la muestra está vaporizada en el inyector, se puede introducir la totalidad de la muestra en la columna (inyección en modo *splitless*) o sólo una parte (modo *split*). La muestra atraviesa la columna (generalmente capilar) ayudada por el gas portador, que por lo general suele ser helio o nitrógeno, aunque en ocasiones se utiliza

hidrógeno, argón o incluso dióxido de carbono. La principal característica que debe tener la fase móvil es su poca reactividad frente a los analitos a determinar. No obstante, otros factores también son tenidos en cuenta a la hora de elegir el gas portador, tales como el coste, su compatibilidad con el sistema de detección y el grado de pureza.

Una vez los analitos entren en contacto con la fase estacionaria, éstos van a ser separados según la afinidad con la misma, de manera que saldrán de la columna a tiempos de retención distintos. A la salida del sistema, los analitos separados son identificados por el espectrómetro de masas y posteriormente son registrados en un ordenador.

El cromatógrafo se encuentra termostatzado; así pues, se puede controlar la temperatura en todo momento, de forma que se asegura el estado gaseoso tanto de las muestras como del gas portador. El uso de gradientes de temperatura en el horno donde se encuentra la columna es muy útil para separar una mezcla de compuestos de amplio intervalo de puntos de ebullición. Además, el uso de altas temperaturas durante los últimos minutos del análisis previene la acumulación de depósitos en la columna y ayuda a mantenerla limpia y en perfectas condiciones de uso.

Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria, podemos diferenciar dos tipos distintos de cromatografía de gases, (Skoog & Leary, 1994).

**Cromatografía gas-sólido:** La fase estacionaria es un sólido, que tiene un área superficial grande, sobre la que se adsorbe el analito, produciéndose un equilibrio de adsorción entre los componentes gaseosos de la muestra y la fase estacionaria. Se aplica únicamente a la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular (CO, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, hidrocarburos y gases nobles).

**Cromatografía gas-líquido:** Es uno de los métodos más importantes y utilizados para separar y determinar los componentes químicos de mezclas complejas. La fase estacionaria está constituida por un líquido, generalmente un polímero, inmovilizado sobre la propia pared de sílice de la columna o sobre un soporte sólido que recubre dicha pared, bien por adsorción o por un enlace químico (fases enlazadas). La velocidad de migración del analito a través de la columna está determinada por su relación de reparto entre la fase estacionaria líquida y la fase móvil gaseosa. Es por tanto una cromatografía de reparto gas-líquido. Se suelen utilizar columnas capilares de unos 30 metros de longitud y entre 0.05-0.5 mm de diámetro interno, que se enrollan de forma helicoidal para ser introducidas en el horno del cromatógrafo.

---

### II.9.3- Antecedentes en la determinación de BTEXS en aceituna y aceite de oliva

Los antecedentes en el análisis de BTEXS en aceite de oliva son escasos. En la mayoría de los casos, el análisis se lleva a cabo mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, utilizando la técnica de espacio de cabeza con diferentes opciones para la introducción de la muestra en el sistema. Así, metodologías como la micro extracción en fase sólida (HS-SPME), (Vichi, Pizzale, Conte, Buxaderas, & López-Tamames, 2005), el uso de purga y trampa, (Olliver & Guérère, 2001), desorción térmica (Zunin et al., 2004; Cavalli, Fernandez, Lizzani-Cuvelier, & Loiseau, 2003), o simplemente recogiendo el espacio de cabeza que se genera (Peña, Cárdenas, Gallego, & Valcárcel, 2004; Gilbert-López, Robles-Molina, García-Reyes, & Molina-Díaz, 2010c) son las opciones más utilizadas. Sin embargo, en el caso del análisis de aceituna los antecedentes son aún más escasos, habiendo un único método para la determinación de forma directa de estos contaminantes mediante HS-GC-MS, (Gilbert-López et al., 2010c). Dicha metodología ha sido la utilizada como base para los estudios de factores de procesado realizados a través de la determinación de BTEXS tanto en aceituna como en el aceite de oliva extraído de ésta.



---

# Resultados y discusión

---



### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **PARTE I: DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN ACEITES DE OLIVA, ACEITUNA Y OTROS ALIMENTOS DE ALTO CONTENIDO GRASO**

III.1.- EVALUACIÓN DE DIFERENTES SORBENTES UTILIZADOS EN LA ETAPA DE LIMPIEZA PARA EL ANÁLISIS MULTIRRESIDUO DE PLAGUICIDAS EN MATRICES DE ALTO CONTENIDO GRASO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

III.2.- DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POLARES EN ACEITUNA Y ACEITE DE OLIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE INTERACCIÓN HIDROFÍLICA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN





### III.1.- EVALUACIÓN DE DIFERENTES SORBENTES UTILIZADOS EN LA ETAPA DE LIMPIEZA PARA EL ANÁLISIS MULTIRRESIDUO DE PLAGUICIDAS EN MATRICES DE ALTO CONTENIDO GRASO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

Publicado en Journal Chromatography A, volumen 1456, 89-104 el 22 Julio de 2016. doi: [10.1016/j.chroma.2016.06.019](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.019)

#### RESUMEN

El uso de plaguicidas y otros productos fitosanitarios en los cultivos, es una práctica muy común hoy en día, e incluso llega a ser necesaria para asegurar unos buenos rendimientos en las cosechas, evitando el ataque de plagas a los frutos y/o los efectos competitivos de hierbas indeseables. Actualmente, el número de sustancias activas autorizadas y utilizadas para dichos fines es muy amplio, empleándose una gran cantidad de compuestos con diferentes polaridades. El desarrollo de metodologías para la determinación multirresiduo de un amplio número de analitos, es una aplicación en continuo crecimiento; ya sea mediante el uso de técnicas instrumentales avanzadas —como la espectrometría de masas—, la mejora de los tratamientos de muestra previos al análisis de plaguicidas, o el uso de columnas con fases estacionarias optimizadas (HPLC con tamaño de partícula reducido (UHPLC), columnas de núcleo fundido, columnas HILIC, etc.). Este apartado se centra en la etapa de preparación de muestra para la mejora del proceso de análisis.

Los tratamientos de muestra en matrices de alto contenido graso como son aceites comestibles (girasol, oliva, soja, colza, etc.) y alimentos como aceituna, aguacate, salmón y algunos frutos secos son particularmente complejos, ya que estos alimentos poseen un alto número de constituyentes que dificultan el análisis, a la vez que ensucian la instrumentación. Es por ello que una etapa crucial del proceso de análisis es la de limpieza y purificación del extracto. Numerosas técnicas de extracción han sido desarrolladas en los últimos años para dichos fines (GPC, SPE, dSPE, SPME, MSPD, LLE...). Entre ellas, la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) suele ser la más recurrente para el análisis de matrices grasas. De igual manera, distintos sorbentes (amina primaria secundaria (PSA), C18, Florisil, carbón grafitizado (GCB), sílice funcionalizada con ZrO<sub>2</sub> (Z-Sep®) han sido propuestos con el fin de disminuir los efectos de la matriz mientras que se mantienen recuperaciones aceptables de los analitos de interés.

En este apartado se ha evaluado la eficacia de distintos sorbentes para su utilización en la etapa de purificación (*clean-up*) durante el análisis multirresiduo de plaguicidas en matrices de alto contenido graso usando el procedimiento de extracción QuEChERS, basado en la extracción con un disolvente (acetonitrilo) seguida de una purificación mediante dSPE. Para el desarrollo del estudio se seleccionaron tres matrices vegetales representativas con alto contenido graso: aceite de oliva, aceituna y aguacate. Después de la etapa de extracción con acetonitrilo inicial, el sobrenadante se somete a la etapa de purificación con dSPE empleando las tres combinaciones diferentes de sorbentes estudiadas: (i) C18 + PSA, (ii) Z-Sep<sup>+</sup> (óxido de zirconio y C18 enlazados a sílica) ó Z-Sep (óxido de zirconio enlazado a sílica) y (iii) un sorbente de última generación llamado *Enhanced Matrix Removal-Lipid* (EMR-Lipid), de naturaleza y composición todavía no revelada por el fabricante. Las diferentes estrategias fueron evaluadas para el análisis de un total de 67 plaguicidas empleados en el olivar, estudiando sus porcentajes de recuperación, efectos matriz, limpieza del extracto y precisión. Para la determinación de los mismos se utilizó la técnica de cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS). La separación de los analitos se consiguió a través de una columna de C18 a lo largo de 18 min, utilizando agua y acetonitrilo (ambas con 0.1% de ácido fórmico) como fases móviles. Para la detección de los analitos mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo, cada uno de ellos fue optimizado de manera individual, registrando dos transiciones por compuesto.

Los resultados obtenidos en aceite de oliva muestran la viabilidad de la utilización de las tres combinaciones de sorbentes ensayadas. El principal avance que aporta el uso del nuevo sorbente EMR-Lipid con respecto a las combinaciones anteriores, es la mejora de los porcentajes de recuperación, la limpieza de los extractos en comparación los demás sorbentes utilizados y la consiguiente disminución de los efectos matriz. En cambio, se observaron resultados menos satisfactorios para las otras dos matrices ensayadas, debido a la mayor complejidad de las mismas para este tipo de análisis. Tanto los efectos de supresión de señal (efecto matriz) como las recuperaciones fueron similares en aceituna y en aguacate, obteniendo una precisión mejor del 10% en la mayoría de los compuestos estudiados. Los resultados obtenidos del empleo de EMR-Lipid como sorbente en la etapa de *clean-up*, permitieron alcanzar límites de cuantificación en el rango de entre 0.10 y 90  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , asegurando sensibilidad suficiente (como demanda la legislación actual), por lo que dicha estrategia será la utilizada para los estudios sucesivos planteados en esta memoria.

### III.1.- EVALUATION OF DIFFERENT CLEAN-UP SORBENTS FOR MULTIRRESIDUE PESTICIDE ANALYSIS IN FATTY VEGETABLE MATRICES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

#### ABSTRACT

In this article we have evaluated the performance of different sorbents for the clean-up step in multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices using QuEChERS methodology. The three different matrices tested (olive oil, olives and avocado) were partitioned using acetonitrile prior to clean-up step. Afterwards, the supernatant was purified using different sorbents: C18 + PSA (primary secondary amine), Z-Sep<sup>+</sup> (zirconium oxide and C18 dual bonded to silica), Z-Sep (zirconium oxide bonded to silica) and a novel sorbent Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) whose composition has not been disclosed. The different clean-up strategies were compared for a group of 67 representative pesticides in terms of recovery rates, matrix effects, extract cleanliness and precision using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The best extraction efficiencies in olive oil matrix were obtained using EMR-Lipid, while the results for olives and avocado were pretty similar amongst the different sorbents with an overall lower performance in terms of matrix effects and recovery rates compared to olive oil data, particularly in olives due to the higher complexity and concentration of coextracted species. On the other hand, the average reproducibility was clearly better when EMR-Lipid sorbent was employed in all selected matrices for most pesticides (RSD < 10% for 45, 52 and 56 pesticides in avocado, olives and olive oil respectively). The best results in terms of matrix effects were also obtained with EMR-Lipid; with signal suppression lower than 20% for 79%, 16% and 51% of pesticides tested in olive oil, olives and avocado respectively. Using EMR-Lipid as clean-up sorbent, limits of quantitation using UHPLC-MS/MS, ranged from 0.10 to 90  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , allowing their determination at the low concentration levels demanded by current olive oil regulations in most cases.

### III.1.1.- Introduction

The use of pesticides plays an important role in agricultural production reducing the adverse effects of weeds, diseases and pests on crop yield and quality. Their overuse, in contrast, may pose a negative effect on the environment, representing also a risk for human health. To ensure the safety for consumer, the presence of pesticide residues in crops is monitored by European Union (EU), which has established maximum residue levels (MRLs) for pesticides in a wide array of fruits and vegetables (Reglamento (CE) 396/2005). An MRL of 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  has been also set as a default value for pesticide/commodity combinations not included in the Reglamento (CE) 149/2008 Codex Alimentarius has also regulated the control of pesticide residues by the establishment of MRL in several commodities (FAO/OMS, 1999; Malik, Blasco, & Picó, 2010; Masiá, Blasco, & Picó, 2014). In order to increase the productivity of routine laboratories, the use of multi-residue methods is a convenient approach to determine as many pesticides as possible in one single run (Garrido Frenich, Romero-González, & Aguilera-Luiz, 2014). Several methods have been described in literature for the determination of pesticide residues in fatty vegetables using either: GC-MS/MS, (Lu et al., 2015; Lozano et al., 2014; Fernández-Moreno et al., 2006; Rasche, Fournes, Dirks, & Speer, 2015; Anagnostopoulos & Miliadis, 2013) or LC-MS/MS, (Anagnostopoulos & Miliadis, 2013; Rajska et al., 2013; Polgár et al., 2012; Moreno-González et al., 2014) depending on the targeted analytes.

For this purpose, different methodologies have been proposed as sample clean-up step in different fatty vegetable commodities such as solid-phase extraction (SPE), (Hernández et al., 2006; Grant, Rodgers, Chickering, Hil, & Stry, 2010; Esteve-Turrillas, Pastor, & De La Guardia, 2005) matrix solid-phase dispersion (Zhan et al., 2016; Cunha, et al., 2007a; Gilbert-López et al., 2010a), gel permeation chromatography (Fernández-Moreno et al., 2006) or freezing/low-temperature clean-up procedures (Li, L., et al., 2007). The combination of two or more clean-up procedures has also been proposed (Nguyen, Lee, & Lee, 2010; Amvrazi & Albanis, 2009). These approaches could be somewhat time consuming, involving several steps to remove the lipophilic fraction from the sample extracts while simultaneous efforts recovery rates are also demanded.

Recently, a paradigm shift towards simplicity and high-throughput has been experienced in the field, and it can be attributed to the combined use of generic solvent extraction along with dilute-and-shoot strategies, thanks also to the progress of LC-MS/MS instrumentation, (Wilkowska & Biziuk, 2011; González-Curbelo et al., 2015). However, the multiresidue determination of pesticide residues in fatty matrices such as edible oils or fatty vegetables (*eg.* those with a fat percentage higher than 10 % (Gilbert-López, García-Reyes, & Molina-Díaz, 2009) such as olives or avocado) yet constitutes a challenging application, provided the high

percentage of lipid components that may be coextracted during the sample treatment stage using generic multi-residue methods such as QuEChERS method adapted for fatty matrices (Cunha et al., 2007b). So, the analysis of pesticides at low concentrations levels in this type of matrices requires clean-up/removal of matrix interferences prior to analysis for proper performance and increased productivity/operation time of LC-MS/MS instruments. For this reason, efforts should be conducted to fine tune the clean-up step with the aim to remove interfering species from the sample extract prior to LC-MS/MS, without remarkable analyte losses is a interesting strategy. The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) sample treatment approach has been adapted and proposed to the analysis of pesticides in fatty matrices using the most common dispersive SPE (dSPE) sorbents such as PSA, C18 and graphitized carbon black as described elsewhere (Anagnostopoulos & Miliadis, 2013; Polgár et al., 2012; Chamkasem et al., 2013).

Recently, new dispersive sorbents based on zirconium oxide have been proposed for the removal of co-extracted lipids prior to pesticide analysis of fatty vegetable commodities such as avocado or almonds by either GC-MS/MS (Lu et al., 2015; Lozano et al., 2014; Nieto-García et al., 2015) or LC-MS/MS (Rajski et al., 2013; Moreno-González et al., 2014). Two variants of zirconium oxide are currently available: Z-Sep (ZrO<sub>2</sub> bonded silica) and Z-Sep<sup>+</sup> (ZrO<sub>2</sub> and C18 dual bonded to silica), (Supelco, 2016). The studies conducted so far with these sorbents on edible oils such as olive oil are limited to 30 carbamates, whereas its use for demanding samples such as olives has not been tested yet. On the other hand, as an alternative to zirconia-based clean-up, a new sorbent named Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid), whose composition has not been disclosed yet (Agilent Technologies Inc, 2016a), has been recently introduced. This new material is expected to remove major lipid classes from sample matrix without unwanted analyte loss (Agilent Technologies Inc, 2016b), although as far as we are aware of, there are no independent research studies on their performance for pesticide determination in fatty matrices.

In this article, the performance of different sorbents for the clean-up step in pesticide analysis have been examined for three different matrices: olive oil, olives and avocado. The extract obtained after acetonitrile partitioning was subjected to three different sorbents: C18+PSA (primary secondary amine), Z-Sep (zirconium oxide) or Z-Sep<sup>+</sup> (zirconium oxide and C18 groups) and the novel sorbent of unknown composition (EMR-Lipid). The different clean-up strategies were compared for a group of 67 representative pesticides in terms of recovery rates, matrix effects, precision and sensitivity using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). To our knowledge, this is the first report on the comparison of zirconia-based sorbents and EMR-Lipid.

### III.1.2.- Experimental

#### III.1.2.1.- Pesticides standards and reagents

HPLC-grade acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid Spain). PSA and EMR-Lipid sorbents were obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) whereas Z-Sep+/Z-Sep, sodium chloride, anhydrous magnesium sulfate and formic acid were supplied by Sigma-Aldrich (Sulpeco® and ReagentPlus® respectively). C18 were bought from Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain), and acetic acid (HOAc) from J.T. Baker (Center Valley, PA, USA). A Milli-QPlus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA) was used throughout the study to obtain the HPLC-grade water used during the analyses.

Up to 67 multiclass pesticides including insecticides, herbicides, fungicides and acaricides, most of them typically used in olive grove were included in the study (table III.1). All of these have been accounted for the Reglamento (CE) 396/2005, (last annex 1/2016). Each analytical quality standard (> 99% purity) was purchased from Sigma-Aldrich or Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Individual pesticide stock solution (ca. 500 µg·mL<sup>-1</sup>) were prepared in MeOH or MeCN and stored at -20 °C. Then, a working solution containing the mixture of standards was prepared (5 µg·mL<sup>-1</sup>) in MeCN and also kept at -20 °C.

**Table III.1: Classification of the pesticides studied according to active substances, Log Kow values and their use in olives groves.**

Pesticide	Log Kow	Chemical Family	Usefulness
Acephate	-0.85	Organophosphorous	Insecticide
Acetamiprid	0.80	Neocotinoide	Insecticide
Alachlor	3.09	Chloroacetamide	Herbicide
Amitraz	5.50	Amidine	Acaricide/Insecticide
Atrazine	2.50	Triazine	Herbicide
Avermectin B1a	4.40	Avermectin	Acaricide/Insecticide
Azinphos-methyl	2.96	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Azoxystrobin	2.50	Strobilurin	Fungicide
Benalaxyl	3.54	Acylalanine	Fungicide
Buprofezin	4.93	Benzoylurea	Acaricide/Insecticide
Carbaryl	2.36	Carbamate	Acaricide/Insecticide/Plant Grow
Carbendazim	1.50	Benzimidazole	Fungicide
Carbofuran	1.80	Carbamate	Acaricide/Insecticide/Nematicide
Carfentrazone-ethyl	3.36	Triazolinone	Herbicide

Pesticide	Log Kow	Chemical Family	Usefulness
Chlorfenvinphos	4.04	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Chlorotoluron	2.50	Urea	Herbicide
Chlorpyrifos	4.70	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Chlorpyrifos-methyl	4.00	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Diazinon	3.69	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Difenoconazole	4.36	Triazole	Fungicide
Diflufenican	4.20	Pyridinecarboxamide	Herbicide
Dimethoate	0.70	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Dimethomorph	2.72	Cinnamic acid	Fungicide
Diuron	2.87	Urea	Herbicide
Dodine	1.29	Guanidine	Fungicide
Ethion	4.28	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Etofenprox	6.90	Pyrethroid	Insecticide
Fenamiphos	3.30	Organophosphorous	Nematicide
Fenamiphos-sulfone	1.75	Organophosphorous	Metabolite
Fenhexamid	3.51	Hydroxyanilide	Fungicide
Fenthion	4.84	Organophosphorous	Insecticide
Fenthion-sulfoxide	1.63	Organophosphorous	Insecticide
Flufenoxuron	4.00	Benzoylurea	Insecticide
Imidacloprid	0.57	Neocotinoide	Insecticide
Isoproturon	2.50	Urea	Herbicide
Kresoxim-methyl	3.40	Strobilurin	Fungicide
Malaoxon	2.07	Organophosphorous	Metabolite
Malathion	2.92	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Metalaxyl	1.75	Acylalanine	Fungicide
Methamidophos	-0.80	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Methidathion	2.20	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Methomyl	0.01	Oxime carbamate	Insecticide
Monocrotophos	-0.22	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Norflurazon	2.45	Pyridazinone	Herbicide
Omethoate	-0.74	Organophosphorous	Acaricide/Insecticide
Paclobutrazol	3.11	Triazole	Plant Grow
Penconazole	3.72	Triazole	Fungicide
Phosmet	2.96	Organophosphorous	Insecticide
Pirimiphos-methyl	4.20	Organophosphorous	Insecticide
Propargite	5.70	-	Acaricide

Pesticide	Log Kow	Chemical Family	Usefulness
Pyrimethanil	3.00	Anilinopyrimidine	Fungicide
Pyriproxifen	5.37	Juvenile hormone mimic	Insecticide
Quinalphos	4.44	Organophosphorous	Insecticide
Quinmerac	-1.41	Quinolinecarboxylic acid	Herbicide
Quizalofop-p-ethyl	3.06	Ariloxifenoxi Propionato	Herbicide
Rotenone	4.16	Rotenoide	Insecticide
Simazine	2.10	Triazine	Herbicide
Spinosyn A	4.00	Spynosin	Insecticide
Spinosyn D	4.00	Spynosin	Insecticide
Tebuconazole	3.70	Triazole	Fungicide
Terbuthylazine	3.40	Triazine	Herbicide
Terbuthylazine-desethyl	1.85	Triazine	Metabolite
Tetraconazole	3.56	Triazole	Fungicide
Thiacloprid	1.26	Neocotinoide	Insecticide
Thiamethoxam	-0.13	Neocotinoide	Insecticide
Thiophanate-methyl	1.45	Benzimidazole	Fungicide
Trichlorfon	0.43	Organophosphorous	Insecticide

### III.1.2.2.- Sample treatment

Olive oil and avocado samples were purchased from the local market, whereas olives (picual variety) were collected from an olive grove (Jaén, Spain). Prior to extraction, olives and avocado samples were crushed using a mill (Talleres Lopera (Priego de Córdoba, Spain)) and a hand blender (Braun, Aschaffenburg, Germany) respectively. These samples were stored at -20 °C until the analyses.

#### i).- Procedure I: QuEChERS AOAC.2007.01

The official QuEChERS method adapted for pesticide analysis in fatty matrices (Association of Analytical Communities (AOAC Official Method, 2007)) uses MeCN as solvent. A representative portion of 10 g of homogenized sample (in the case of olive oil, 3 g of fat + 7 mL H<sub>2</sub>O Milli-Q) was weighed into 50 mL centrifuge tube; 10 mL MeCN (1% HOAc) were added together with 4 g of MgSO<sub>4</sub> and 1 g of NaCl and immediately shaken for 1 min. The extract was centrifuged at 5000 rpm for 5 min. For the clean-up step, 5 mL of the upper layer (organic phase) were transferred into a 15 mL centrifuge tube, which previously contained the sorbents used (250 mg of PSA, 250 mg of C18 and 750 mg of anhydrous MgSO<sub>4</sub>). The mixture was shaken 30 seconds and then was

centrifuged at 5000 rpm for 5 min. Afterwards, 3 mL of supernatant (MeCN) were transferred into a test tube.

In all cases, the evaporation and reconstitution step were suppressed to increase throughput and ruggedness as some analytes may be lost during this step. Therefore, a simple dilution 1:10 with H<sub>2</sub>O Milli-Q followed by filtration through PTFE (0.45 µm) filters (Sartorius (Gottinga, Germany)) was conducted. The final extract composition was H<sub>2</sub>O:MeCN (90:10), matching the initial mobile phase composition of the gradient elution method.

#### ii).- Procedure II: QuEChERS adapted for extraction with Z-Sep<sup>+</sup> or Z-Sep sorbents

Instead of PSA and C18, the dispersive SPE sorbent was 250 mg Z-Sep<sup>+</sup> for olive oil samples and 250 mg Z-Sep for olives and avocado samples, sorbents.

#### iii).- Procedure III: EMR-Lipid method dSPE

The initial extraction step was also analogous to the official method AOAC.2007.01 (10 g of sample + 10 mL MeCN + 4 g MgSO<sub>4</sub> and 1 g NaCl). First of all, EMR-Lipid sorbent was activated with 5 mL of H<sub>2</sub>O Milli-Q prior to use, added in the centrifuge tube containing the sorbent. Then, 5 mL of acetonitrile extract from sample partitioning were added, being the tube shaken for 1 min and then centrifuged at 5000 rpm for 5 min. After this step, 5 mL of the obtained supernatant were transferred with a second centrifuge tube, which contained 1.6 g of MgSO<sub>4</sub> and 0.4 g of NaCl, being shaken and centrifuged. A 1:10 dilution of the organic phase with H<sub>2</sub>O Milli-Q was performed so that the final extract matches the mobile phase composition. No filtration was required except in the case of olive extract.

#### III.1.2.3.- Calibration curves

Matrix-matched calibration curves were established at six different concentration levels for each analyte (1, 5, 10, 50 and 100 µg·kg<sup>-1</sup>) by spiking blank samples of the selected matrices after the extraction process. External standard calibration curves were established with the same final concentrations levels (considering the proposed QuEChERS method). The matrix effect was evaluated for each pesticide in the different matrices, by comparing the slopes of matrix-matched calibration curves with the slopes of external standard calibration curves (Matuszewski, Constanzer, & Chavez-Eng, 2003; Reglamento (UE) 400/2014). This fact is a sizeable step to evaluate the efficiency of the better sorbent since co-extractants could be able to interfere or to reduce the analytical signal compared with the obtained in solvent-based

standard. Fatty matrices are complex and usually affect, above all, if the sorbent used does not clean sufficiently the extracts and removes possible co-eluent. Blank extracts of samples were also measured to ensure they did not contain the studied compounds.

#### III.1.2.4.- Recovery study

For recovery studies, the previously homogenized samples (section III.1.2.2) were spiked with a mixture of the 67 studied pesticides. A portion of homogenized samples were weighted and fortified homogeneously with appropriate volume of working standard solution to reach 10 or 100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of the studied pesticides. Then the sample was homogenized and incubated at room temperature for 4 h. Recovery rates were calculated for each pesticide by means of interpolation of the areas integrated in the quantification peaks with the matrix-matched calibration curves. The corresponding dilution factor used in each extraction procedure (1:10) was applied to the values obtained. Due to the extraction procedure in olive oil, in which only 3 g of sample were weighed, a higher dilution was achieved and was also considered. Thus, the final extract concentration was 0.03 g oil extract $\cdot\text{mL}^{-1}$  of MeCN while in the rest of procedures was 0.1 g extract $\cdot\text{mL}^{-1}$  in MeCN. The precision of the method was evaluated in terms of repeatability by means of the calculation of % RSD values ( $n=6$ ) for all sorbents evaluated.

#### III.1.2.5.- Liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry (LC-QqQ-MS/MS)

The separation of the analytes was carried out using Dionex Ultimate 3000 rapid separation liquid chromatograph (RSLC) (Thermo Scientific, USA) instrument. This was equipped with an Agilent Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) Eclipse Plus C18 column (2.1 mm x 50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$  particle size). Mobile phase consisted of 0.1% aqueous formic acid solution (solvent A) and MeCN with the same percentage of acid (solvent B) at a flow rate of 0.3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The temperature of the column was 25  $^{\circ}\text{C}$  and the injection volume was 10  $\mu\text{L}$ . The gradient profile held the initial mobile phase composition (5% B) constant for 3 min, followed by a linear gradient to 100% B at 18 min, being 100% B held for two additional minutes.

The UHPLC system was connected to a TSQ Endura triple quadrupole (QqQ) (Thermo Scientific, USA) equipped with a heated electrospray ionization probe (HESI) operating in positive ion mode with the following operation parameters: spray voltage: 3500 V; sheath gas 45; aux gas 13 arbitrary units; ion transfer tube temperature 342  $^{\circ}\text{C}$ ; vaporizer temperature 358  $^{\circ}\text{C}$ ; collision gas (CID) 1.5 mTorr. Multiple reaction monitoring (MRM) transitions was optimized for each compound (table III.2). XCalibur software 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA,

USA) was used for method development, whereas Tracefinder software 3.2.5.12.0 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) was employed for data analysis.

Table III.2: UHPLC-MS/MS parameters for the determination of the studied pesticides

Pesticide	RT (min)	Precursor (m/z)	Q. Peak (m/z)	CE (V)	C. Peak (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)
Methamidophos	0.85	142.025	94.196	14.6	125.047	13.1	52
Acephate	1.22	184.025	143.048	6.6	125.093	17.6	38
Omethoate	1.74	214.050	182.991	10.6	125.109	23.6	63
Carbendazim	3.90	192.100	160.087	18.1	132.151	31.1	67
Methomyl	5.13	163.050	88.214	7.6	106.142	9.1	30
Monocrotophos	5.97	224.100	127.114	16.6	109.136	32.1	60
Thiamethoxam	6.51	292.050	211.059	12.1	181.09	23.1	68
Trichlorfon	6.67	257.025	109.198	20.1	220.955	10.1	130
Quinmerac	6.95	222.075	204.044	16.1	141.145	35.6	68
Imidacloprid	7.42	256.100	209.092	16.6	175.166	19.1	77
Dimethoate	7.50	230.050	198.908	7.6	125.089	22.6	53
Acetamiprid	7.80	223.100	126.118	21.6	99.170	40.6	76
Thiacloprid	8.62	253.075	126.116	22.6	99.172	43.1	102
Simazine	8.77	202.100	124.184	18.6	132.097	19.6	96
Pyrimethanil	8.90	200.150	183.139	24.6	168.128	31.6	118
Terbutylazine-desethyl	9.20	202.100	146.092	16.1	104.147	29.1	67
Thiophanate-methyl	9.63	343.075	151.109	20.6	93.256	45.6	90
Fenamiphos-sulfone	9.66	336.150	266.046	20.1	308.044	15.1	103
Malaoxon	9.68	315.100	127.137	13.1	99.173	24.6	75
Carbofuran	9.74	222.150	165.150	11.6	123.163	22.6	61
Fenthion-sulfoxide	9.88	295.075	279.961	19.1	109.142	33.6	146
Chlorotoluron	9.97	213.125	72.331	20.1	140.118	25.6	89
Atrazine	10.00	216.125	174.109	17.1	96.227	25.1	86
Carbaryl	10.14	202.100	145.131	9.1	127.144	29.6	36
Isoproturon	10.33	207.175	72.334	19.6	165.145	14.1	81
Metalaxyl	10.34	280.200	220.131	14.6	160.175	24.6	78
Diuron	10.44	233.050	72.319	20.1	160.033	28.6	82
Norflurazon	10.69	304.100	284.051	24.1	160.108	33.1	133
Dimethomorph	11.20	388.200	301.038	20.1	165.133	32.6	116

Pesticide	RT (min)	Precursor (m/z)	Q. Peak (m/z)	CE (V)	C. Peak (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)
Paclobutrazol	11.26	294.175	70.341	22.1	125.135	37.1	99
Methidathion*	11.34	302.950	85.241	21.6	-	-	56
Spinosyn A	11.41	732.500	142.229	29.1	98.288	41.1	181
Dodine	11.42	228.300	57.446	24.6	71.404	22.6	110
Terbuthylazine	11.47	230.150	174.100	17.1	68.321	38.6	82
Spinosyn D	11.83	746.500	142.240	28.6	98.299	40.1	175
Azinphos-methyl	11.87	261.025	125.091	19.1	167.068	16.1	82
Fenamiphos	11.93	304.150	217.047	23.6	202.056	37.1	104
Phosmet	12.13	317.950	160.080	15.1	133.118	37.1	70
Fenhexamid	12.22	302.100	97.280	25.1	-	-	121
		304.100	-	-	97.286	25.6	118
Azoxystrobin	12.22	404.200	372.116	13.6	344.121	25.1	100
Tebuconazole	12.31	308.200	70.349	24.1	125.12	38.1	110
Tetraconazole	12.36	372.075	159.044	31.6	70.338	23.6	127
Penconazole	12.57	284.125	159.041	29.1	70.327	19.6	96
Buprofezin	12.59	306.200	201.121	11.1	116.283	16.6	64
Alachlor	12.85	270.150	238.102	11.1	-	-	65
		238.125	-	-	147.176	27.1	96
Malathion	12.99	331.075	127.259	13.1	99.169	23.6	74
Rotenone	13.00	395.225	213.153	23.1	191.186	37.1	128
Chlorfenvinphos	13.21	359.025	155.037	13.1	99.149	30.1	99
Difenoconazole	13.43	406.150	251.026	26.1	336.982	16.1	135
Benalaxyl	13.46	326.225	148.219	22.6	294.189	9.1	90
Quinalphos	13.49	299.100	163.089	22.1	147.128	23.6	104
Kresoxim-methyl	13.49	314.175	222.143	12.6	235.077	15.6	55
Carfentrazone-ethyl	13.50	412.125	345.997	23.6	365.985	17.6	143
Pirimiphos-methyl	13.58	306.150	164.187	23.6	108.210	33.1	132
Fenthion	13.79	279.075	247.007	12.6	169.047	18.6	98
Diazinon	13.79	305.150	169.107	22.1	153.193	21.6	114
Chlorpyrifos-methyl	14.29	321.925	289.938	17.6	125.094	22.6	152
Amitraz	14.37	294.150	163.173	15.6	122.225	30.1	85
Diflufenican	14.52	395.150	266.042	24.6	246.060	34.6	108
Quizalofop-p-ethyl	14.76	373.150	299.084	18.6	271.104	25.6	127

Pesticide	RT (min)	Precursor (m/z)	Q. Peak (m/z)	CE (V)	C. Peak (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)
Pyriproxifen	15.39	322.200	96.219	17.6	185.102	23.6	89
Flufenoxuron	15.63	489.075	158.116	20.6	141.112	41.6	129
Chlorpyrifos	15.65	350.000	197.968	20.6	-	-	88
		351.975	-	-	199.958	20.1	89
Ethion	15.80	384.950	199.050	9.0	143.049	27.1	98
Propargite	16.17	368.225	231.282	9.1	175.192	16.6	84
AvermectinB1a	16.38	895.425	751.377	41.1	449.305	39.6	293
Etofenprox	17.59	359.175	289.135	23.6	182.636	25.1	141

RT: Retention time; Q. Peak: Quantification peak; CE: Collision energy; C. Peak: Confirmation peak

### III.1.3.- Results and discussion

#### III.1.3.1.- UHPLC-MS/MS method development considerations

For the analysis of target pesticides by UHPLC-MS/MS, an MRM method was developed. Individual optimization was conducted using an external syringe pump connected by a Tee piece merged to an HPLC stream ( $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  50/50 (v/v) both with 0.1% of formic acid). During analyte infusions, both the tube lens voltage and collision energy of the two most abundant transitions were also optimized. The detailed optimized parameters and MRM transitions are shown in table III.2. To set the retention times of each compound a full scan (FS) experiment in the range of 50-1050 m/z was carried out. Each compound was characterized by its retention time and two precursor-product ion transitions. The most intense product ion was used for quantification whereas the second one was used to complete the confirmation (table III.2). According to SANTE European Quality Control guidelines (SANTE/11945/2015), the ratio between quantification and the confirmation must be used for confirmatory purposes. This ratio could have a 30% of variability (tolerance) in samples with respect to the ratio in standard solutions at the same concentration level. In the case of methidathion, the calculation of these ratios was not possible because the intensity of the confirmation transition was very low. For the rest of the studied compounds this tolerance was lower than 30%, being in agreement with the current legislation.

In most cases, the protonated molecule ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) was selected as precursor ion. However, in few cases  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ion was not detected. In the case of etofenprox and propargite, ammonium adduct was obtained as major precursor ion instead whereas for avermectin B1a, sodium adduct was the more abundant ion observed. Finally, only for azinphos-methyl, the fragment

corresponding to  $[M+H-46]^+$  exhibited distinctly higher abundance than the protonated molecule, being thus selected for quantification purposes.

### III.1.3.2.- Evaluation of the sample treatment procedures

The performance of the different dSPE sorbents proposed in the matrices studied (olive oil, olives and avocado) was evaluated using the following analytical figures: recovery rates, matrix effects and extract cleanliness, and repeatability.

First, as a preliminary study in an attempt to estimate the effectiveness of the different clean-up procedures examined, the full-scan total ion chromatograms (TICs) collected in the positive ion mode were overlapped for comparison purposes (figure III.1). Blank matrix extracts using all dSPE sorbents were injected using an UHPLC-time-of-flight mass spectrometer (Agilent 1290/Agilent 6220 accurate mass TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) operated in full-scan acquisition and in the positive ionization mode with the same column and gradient used for UHPLC-MS/MS. As shown in figure III.1a, TICs obtained from olive oil extracts were practically

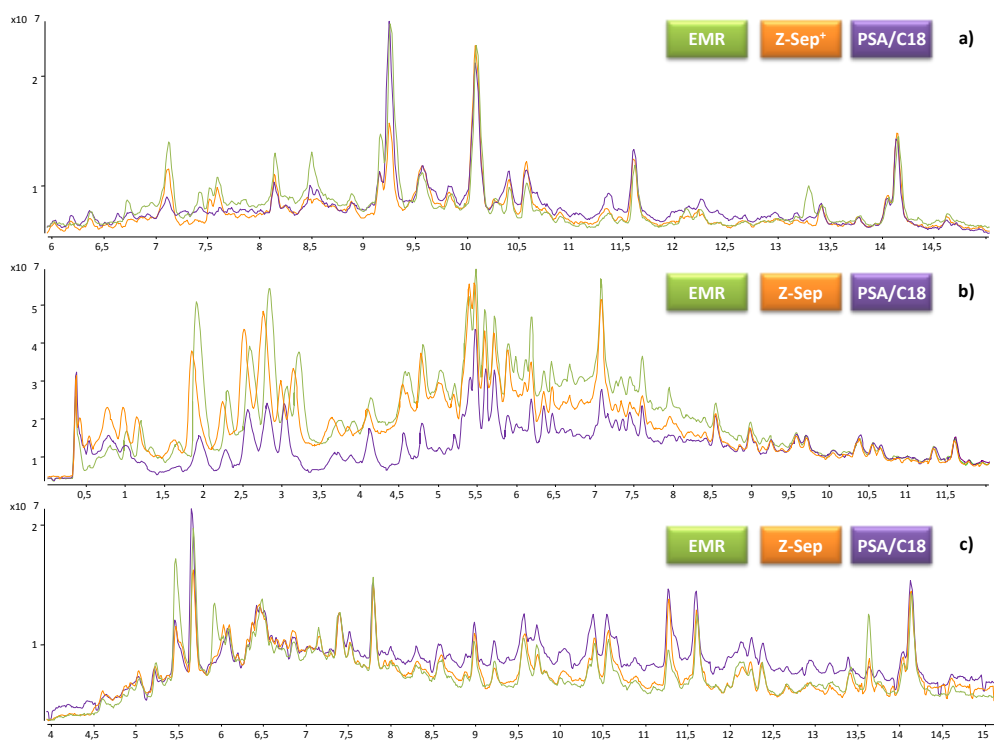


Figure III. 1: Overlapped total ion chromatograms obtained from UHPLC-TOFMS analysis in full scan mode (positive ion mode) of sample extracts obtained after clean-up with different sorbents tested: a) olive oil, b) olives and c) avocado

identical for the three sorbents tested. On the other hand, in the case of olives extracts, the cleaner chromatogram was obtained using PSA + C18 (figure III.1b), however, at the expense of reducing analyte recovery rates in some cases, as some target analytes were lost during clean-up as described below. Meanwhile, the amount of coextracted species in olives extracts was similar in the case of EMR-Lipid and Z-Sep. For avocado extracts, the clean-up effectiveness was quite similar for EMR-Lipid and Z-Sep sorbents as well (figure III.1c). The first conclusion we extracted from these nearly identical TICs was that the novel sorbent could be of similar nature or even the same of zirconia-based sorbents (Z-Sep/Z-Sep<sup>+</sup>). As the composition of the newest sorbent (EMR-Lipid) has not been disclosed yet due to intellectual property interests, we conducted an acid mineralization and semi-quantitative ICP-MS analysis of EMR-Lipid and Z-Sep/Z-Sep<sup>+</sup> sorbents, which confirmed the absence of zirconium and other metals such as titanium in the case of EMR-Lipid (data not shown). In addition, ATR-FTIR experiments provided evidence of strong signals in the fingerprinting region where zirconium oxide bands appear as expected in the case of Z-Sep/Z-Sep<sup>+</sup> sorbents, whereas the spectra obtained with EMR-Lipid confirmed the different nature of the sorbent with the absence of the bands displayed by zirconia sorbents.

#### *Olive oil*

Compared with the studies with olives and avocado, the results obtained on the clean-up step with olive oil extracts with the three different sorbents were highly satisfactory. This can be attributed to the high complexity of olives and avocado matrices, whose composition, combining a high percentage of hydrophilic species and a relatively high percentage of fat as well, makes difficult to attain clean extracts. In terms of extraction efficiency, according to the results shown in table III.3, EMR-Lipid was found the sorbent that recovered a higher number of compounds with satisfactory rates. Actually, 55 out of the 67 of the analytes provided recovery rates between 70-120% (figure III.2), recommended values by the European guide (SANTE/11945/2015). The rest of compounds (12) were recovered in the range from 30 to 70%, being in most cases the recoveries of these species above 60 % and with appropriate precision as shown in figure III.2, where recovery rates are plotted against the octanol/water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) for the different sorbents tested. This 2D-plot is really interesting in the case of EMR-Lipid (figure III.3a), as eventually, the behaviour of the analytes can be predicted with the log  $K_{ow}$  value. There are two outliers: dodine (log  $K_{ow}$  1.29, 31.8 %) and thiophanate-methyl (log  $K_{ow}$  1.45, 38.5 %), which may exhibit low recoveries due to degradation during extraction rather than the actual interaction with the clean-up sorbent with the subsequent analyte loss. Thiophanate-methyl degrades easily in organic solvents, and this may occur to dodine as well. In contrast, a glimpse of the pattern of the EMR-Lipid results (figure

III.3a) lead to set a boundary starting from values around log Kow 5, where analytes start to exhibit low recoveries, due to their higher lipophilicity.

Hence, they may interact with the sorbent as it occurs with the co-extracted fat material removed. This occurs with chlorpyrifos (log Kow 4.70, 45.3 %), buprofezin (log Kow 4.93, 60.3 %), pyriproxifen (log Kow 5.37, 67.1 %), amitraz (log Kow 5.5, .5 %), propargite (log Kow 5.7, 52,7 %) and etofenprox (log Kow 6.9, 48,2 %). A similar trend can be also observed in the case of the other two sorbents (figure III.3b-c), although some additional species were not recovered.

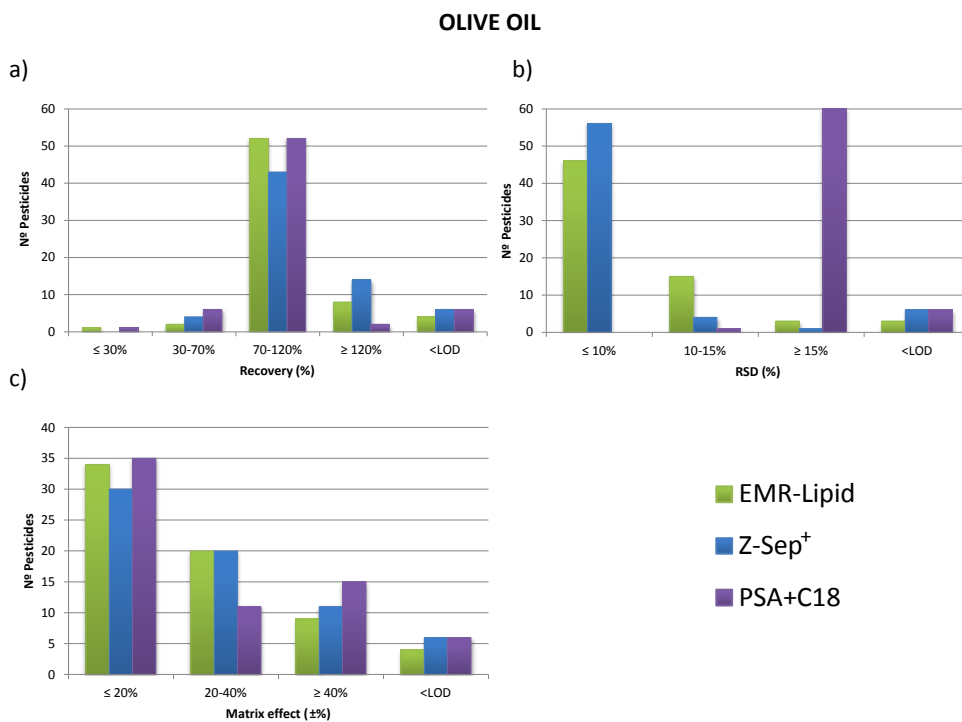


Figure III. 2: Graphical performance of the results obtained in olive oil: a) recovery rates; b) RSD and c) matrix effects

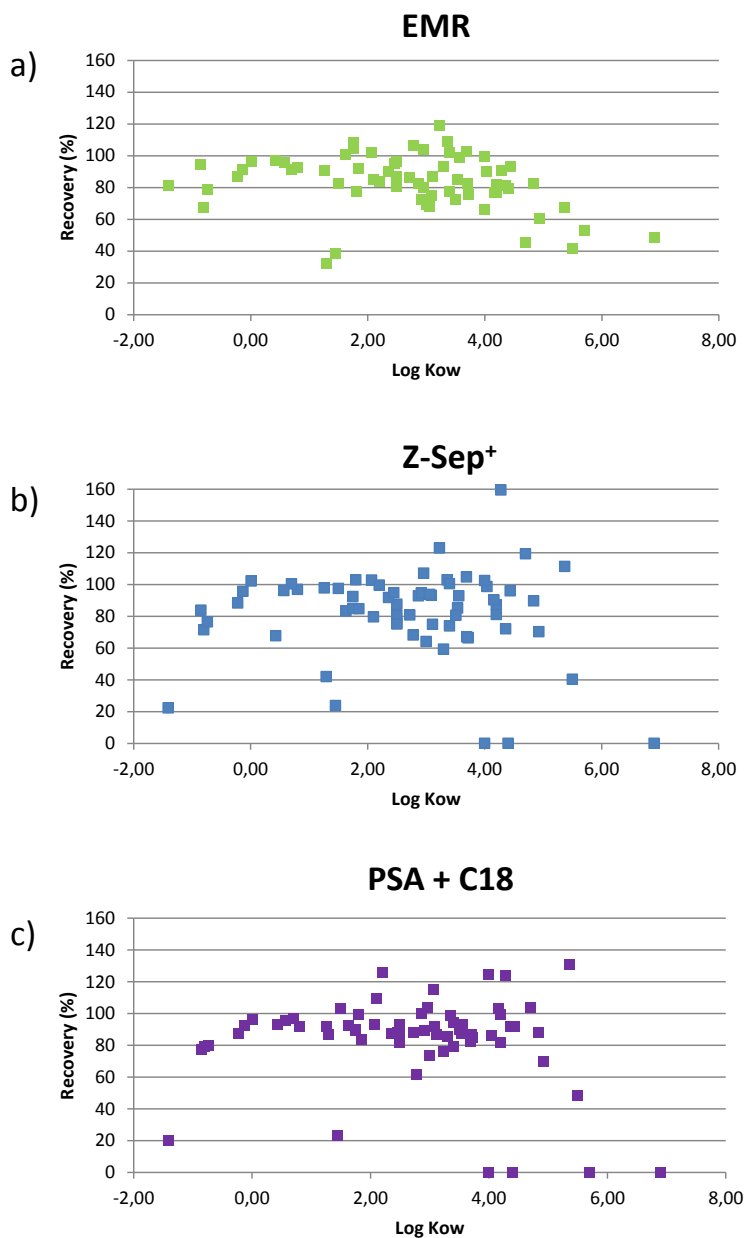
**OLIVE OIL**

Figure III.3: 2D-Plot of the recovery rates/Log Kow in olive oil with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid, (b) Z-Sep<sup>+</sup>, (c) PSA+C18

Table III.3: Recovery rates (RR), RSD (n=6) and matrix effects (ME) for each sorbent in olive oil

	EMR-Lipid			Z-Sep <sup>+</sup>			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
Acephate	94.4	8.5	1.14 (+14%)	83.8	5.7	1.19 (+19%)	77.0	9.6	1.15 (+15%)
	80.0	7.4							
Acetamiprid	92.3	2.6	1.17 (+17%)	96.8	5.8	1.15 (+15%)	91.4	3.1	0.98 (-2%)
	81.7	5.6							
Alachlor	74.7	5.4	1.18 (+18%)	93.2	5.0	1.06 (+6%)	91.7	5.6	0.91 (-9%)
	< LOD	-							
Amitraz	41.5	12.6	1.16 (+16%)	40.3	12.3	1.02 (+2%)	48.6	6.8	1.04 (+4%)
	< LOD	-							
Atrazine	80.3	3.1	1.00 (0%)	75.8	5.5	1.00 (0%)	81.5	3.7	0.91 (-9%)
	< LOD	-							
Avermectin B1a	79.4	19.4	1.52 (+52%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Azinphos-methyl	79.5	10.4	1.15 (+15%)	107.1	10.3	1.03 (+3%)	104.0	5.3	0.95 (-5%)
	< LOD	-							
Azoxystrobin	96.1	5.1	1.14 (14%)	87.6	4.1	1.05 (+5%)	93.1	3.1	0.96 (-4%)
	91.9	2.8							
Benalaxyl	84.8	2.6	1.03 (+3%)	85.2	5.5	0.97 (-3%)	87.3	4.3	0.80 (-20%)
	88.4	2.6							
Buprofezin	60.3	3.4	1.37 (+37%)	70.3	4.2	0.87 (-13%)	69.9	4.0	0.76 (-24%)
	25.4	10.0							
Carbaryl	89.9	3.4	1.02 (+2%)	91.7	4.5	1.00 (0%)	87.4	4.3	0.87 (-13%)
	< LOD	-							
Carbendazim	82.3	4.3	1.22 (+22%)	97.5	7.5	1.07 (+7%)	102.7	3.6	1.06 (+6%)
	98.3	4.1							
Carbofuran	77.1	2.0	1.08 (+8%)	102.9	5.3	0.76 (+24%)	99.4	3.0	0.68 (-32%)
	93.1	7.5							
Carfentrazone-ethyl	109.0	4.3	1.20 (+20%)	102.8	4.8	0.98 (-2%)	98.4	9.8	0.74 (-26%)
	98.8	12.7							
Chlorfenvinphos	89.9	6.2	1.22 (+22%)	98.7	4.5	0.89 (-11%)	86.4	7.5	0.63 (-37%)
	71.2	10.7							

	EMR-Lipid			Z-Sep <sup>+</sup>			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
Chlorotoluron	84.8	3.2	1.03 (+3%)	80.4	5.0	1.02 (+2%)	90.5	2.0	0.96 (-4%)
	91.4	4.8							
Chlorpyrifos	45.3	19.5	1.02 (+2%)	119.3	20.2	0.11 (-89%)	103.4	8.3	0.05 (-95%)
	51.4	8.4							
Chlorpyrifos-methyl	65.9	13.1	0.38 (-62%)	102.4	9.7	0.39 (-61%)	124.7	9.0	0.43 (-57%)
	< LOD	-							
Diazinon	102.3	13.7	1.04 (+4%)	104.6	15.0	1.54 (+54%)	82.3	11.5	1.50 (+50%)
	120.5	14.7							
Difenoconazole	81.0	3.0	0.99 (-1%)	72.1	3.6	0.41 (-59%)	91.8	4.6	0.23 (-77%)
	< LOD	-							
Diflufenican	81.9	4.8	1.15 (+15%)	87.1	7.8	0.31 (-49%)	99.2	6.2	0.13 (-87%)
	< LOD	-							
Dimethoate	91.3	5.0	1.15 (+15%)	100.3	6.2	1.13 (+13%)	96.8	3.3	1.04 (+4%)
	90.3	5.3							
Dimethomorph	85.9	4.6	1.01 (+1%)	80.8	4.2	0.84 (-16%)	88.1	3.6	0.70 (-30%)
	72.5	5.4							
Diuron	82.2	7.0	1.04 (+4%)	92.9	5.8	1.00 (0%)	99.8	6.4	0.94 (-6%)
	< LOD	-							
Dodine	31.8	13.3	1.02 (+2%)	42.0	10.9	0.36 (-64%)	86.8	11.9	0.17 (-83%)
	< LOD	-							
Ethion	90.5	8.8	0.97 (+3%)	159.4	10.3	0.06 (-94%)	124.0	14.7	0.08 (-92%)
	< LOD	-							
Etofenprox	48.2	13.4	1.23 (+23%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Fenamiphos	93.0	6.0	0.84 (+16%)	59.3	4.2	1.03 (+3%)	85.3	4.7	0.93 (-7%)
	102.8	4.4							
Fenamiphos-sulfone	104.2	7.5	1.33 (+33%)	92.3	5.0	1.38 (+38%)	89.0	2.3	1.24 (+24%)
	92.0	7.7							
Fenhexamid	72.3	13.7	1.13 (+13%)	80.6	4.5	1.08 (+8%)	89.8	8.3	0.99 (-1%)
	< LOD	-							
Fenthion	82.1	5.8	0.30 (-70%)	89.6	12.0	0.66 (-34%)	88.2	3.9	0.42 (-58%)
	< LOD	-							

	EMR-Lipid			Z-Sep <sup>+</sup>			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
Fenthion-sulfoxide	100.5	7.3	1.86 (+86%)	83.4	3.6	1.07 (+7%)	92.2	3.5	1.00 (0%)
	< LOD	-							
Flufenoxuron	99.1	3.1	1.27 (+27%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	73.0	10.0							
Imidacloprid	95.6	5.7	1.25 (+25%)	96.1	6.0	1.16 (+16%)	95.6	3.8	1.03 (+3%)
	< LOD	-							
Isoproturon	86.7	3.7	1.06 (+6%)	75.1	5.2	1.01 (+1%)	88.4	2.1	0.94 (-6%)
	93.5	2.7							
Kresoxim-methyl	102.1	2.6	1.07 (+7%)	100.4	9.5	0.98 (-2%)	94.3	9.9	0.74 (-26%)
	< LOD	-							
Malaoxon	101.6	5.0	1.13 (+13%)	102.7	5.4	1.12 (+12%)	92.6	1.6	1.06 (+6%)
	117.1	5.0							
Malathion	72.1	15.5	0.93 (-7%)	94.7	5.7	1.13 (+13%)	89.6	10.1	0.88 (-12%)
	< LOD	-							
Metalaxyl	108.2	4.6	1.15 (+15%)	84.8	4.1	1.06 (+6%)	90.1	2.0	0.99 (-1%)
	104.7	4.1							
Methamidophos	67.4	7.3	1.17 (+17%)	71.5	4.8	1.19 (+19%)	79.1	3.9	1.28 (+28%)
	59.8	5.1							
Methidathion	83.7	7.8	1.12 (+12%)	99.5	4.5	1.13 (+13%)	125.7	12.8	1.04 (+4%)
	< LOD	-							
Methomyl	96.0	5.0	1.13 (+13%)	102.1	5.2	1.26 (+26%)	96.3	3.1	1.08 (+8%)
	117.2	4.5							
Monocrotophos	87.0	3.6	1.15 (+15%)	88.3	4.3	1.09 (+9%)	87.5	3.3	1.09 (+9%)
	92.3	5.5							
Norflurazon	94.9	5.3	0.96 (-4%)	94.7	5.6	0.99 (-1%)	88.0	1.7	0.86 (-14%)
	< LOD	5.2							
Omethoate	78.5	4.7	1.09 (+9%)	76.4	5.3	1.12 (+12%)	79.5	4.2	1.21 (+21%)
	77.7	1.8							
Paclobutrazol	86.8	4.0	1.06 (+6%)	74.8	5.7	1.02 (+2%)	87.0	4.8	0.90 (-10%)
	90.5	4.3							
Penconazole	75.7	4.5	1.10 (+10%)	66.4	3.6	0.85 (-15%)	84.6	5.4	0.64 (-36%)
	77.5	5.3							

	EMR-Lipid			Z-Sep <sup>+</sup>			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
Phosmet	103.5	12.8	0.99 (-1%)	263.9	8.1	0.40 (-60%)	275.4	11.4	0.33 (-67%)
	< LOD	-							
Pirimiphos-methyl	76.7	3.7	1.05 (+5%)	81.1	5.1	1.26 (+26%)	81.7	3.6	1.10 (+10%)
	81.0	5.5							
Propargite	52.7	8.3	1.05 (+5%)	224.3	12.5	0.04 (-96%)	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Pyrimethanil	69.0	4.3	1.11 (+11%)	64.1	5.3	1.07 (+7%)	73.7	4.6	0.99 (-1%)
	58.5	6.1							
Pyriproxifen	67.1	7.0	0.93 (-7%)	111.3	8.6	0.15 (-85%)	130.7	11.3	0.06 (-94%)
	65.6	14.4							
Quinalphos	92.9	2.8	1.14 (+14%)	95.9	3.7	0.92 (-8%)	91.8	7.2	0.65 (-35%)
	44.8	17.3							
Quinmerac	81.1	5.2	1.20 (+20%)	22.3	7.7	1.14 (+14%)	19.8	5.6	1.00 (0%)
	< LOD	-							
Quizalofop-p-ethyl	67.6	4.6	0.98 (-2%)	93.7	8.4	0.33 (-67%)	114.9	5.5	0.18 (-82%)
	59.6	9.6							
Rotenone	76.7	3.7	1.07 (+7%)	90.2	3.7	0.68 (-32%)	103.2	5.3	0.48 (-52%)
	< LOD	-							
Simazine	84.7	2.0	1.01 (+1%)	79.6	5.8	1.01 (+1%)	109.4	3.4	0.95 (-5%)
	< LOD	7.1							
Spinosyn A	106.2	4.8	1.05 (+5%)	68.1	10.5	0.71 (-29%)	61.4	4.7	0.57 (-43%)
	< LOD	11.5							
Spinosyn D	118.5	5.3	0.99 (-1%)	122.9	4.6	0.45 (-55%)	75.7	4.1	0.33 (-67%)
	< LOD	-							
Tebuconazole	82.5	3.5	1.07 (+7%)	66.9	5.3	0.89 (-11%)	87.0	4.2	0.74 (-26%)
	< LOD	-							
Terbutylazine	77.5	2.6	1.08 (+8%)	73.9	5.5	0.95 (-5%)	78.9	2.8	0.69 (-31%)
	< LOD	9.2							
Terbutylazine-desethyl	91.5	2.6	0.97 (-3%)	84.7	5.5	0.98 (-2%)	83.7	3.7	0.94 (-6%)
	< LOD	3.6							
Tetraconazole	98.8	2.5	1.17 (+17%)	92.9	6.8	0.88 (+12%)	92.6	3.5	0.66 (-34%)
	116.3	3.7							

	EMR-Lipid			Z-Sep <sup>a</sup>			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
Thiacloprid	90.4	2.3	1.01 (1%)	97.7	5.1	1.00 (0%)	91.9	3.2	0.91 (-9%)
	< LOD	-							
Thiamethoxam	90.9	5.3	1.10 (+10%)	95.7	4.9	1.12 (+12%)	92.5	3.3	1.00 (0%)
	< LOD	-							
Thiophanate-methyl	38.5	6.0	0.70 (-30%)	23.7	3.8	1.09 (+9%)	23.0	7.7	0.96 (-4%)
	< LOD	-							
Trichlorfon	96.7	9.7	1.04 (4%)	67.7	7.4	1.07 (+7%)	92.8	9.1	0.97 (-3%)
	< LOD	-							
<sup>a</sup> The upper level corresponds to 100 µg·kg <sup>-1</sup> and the lower level corresponds to 10 µg·kg <sup>-1</sup>									
<sup>b</sup> 100 µg·kg <sup>-1</sup>									

The matrix effects were also compared using spiked extracts from the three different sample clean-ups with the sorbents tested. The results are summarized in figure III.2c and illustrated as a 2-D plot versus retention time for each sorbent in figure III.4. Likewise the extraction efficiency, the results were slightly better for EMR-Lipid, with matrix effects lower than 20% in most cases. In the case of Z-Sep and PSA+C18, a significant suppression was observed in the late eluting compounds (*eg.* retention times > 14 minutes). This may be attributed perhaps to a higher concentration of co-extracted lipids than in the case of EMR-Lipid, which did not exhibit the same trend. Finally, it should be mentioned that the precision using EMR-Lipid was also slightly better than that exhibited by the two alternative approaches tested.

According to data collected in this work in terms of recovery, matrix effect and repeatability, EMR-Lipid provides some significant advantages compared to either PSA+C18 or Z-Sep+ for olive oil. Besides, a brief comparison with previous studies conducted in olive oil using PSA+C18 (Polgár et al., 2012) or Z-Sep+ (Moreno-González et al., 2014), (table III.4), also raised slight improvements. For instance, recovery rates were higher for acephate and spinosad whereas matrix effects for methidathion were significantly improved from 51 to 12 %. The overall precision of the method for six replicates was also significantly better than the previous study with PSA+C18, (Polgár et al., 2012). In summary, EMR-Lipid enabled to recover mostly all the pesticides studied at the same time while it could also remove most of the fatty co-extractants, increasing the overall performance of the method by means of diminished matrix effects without

significant analyte loss. Anyway, the performance of the other two tested sorbents is also satisfactory for most of the analytes tested and of course, still can be used for multiresidue pesticide analysis in olive oil.

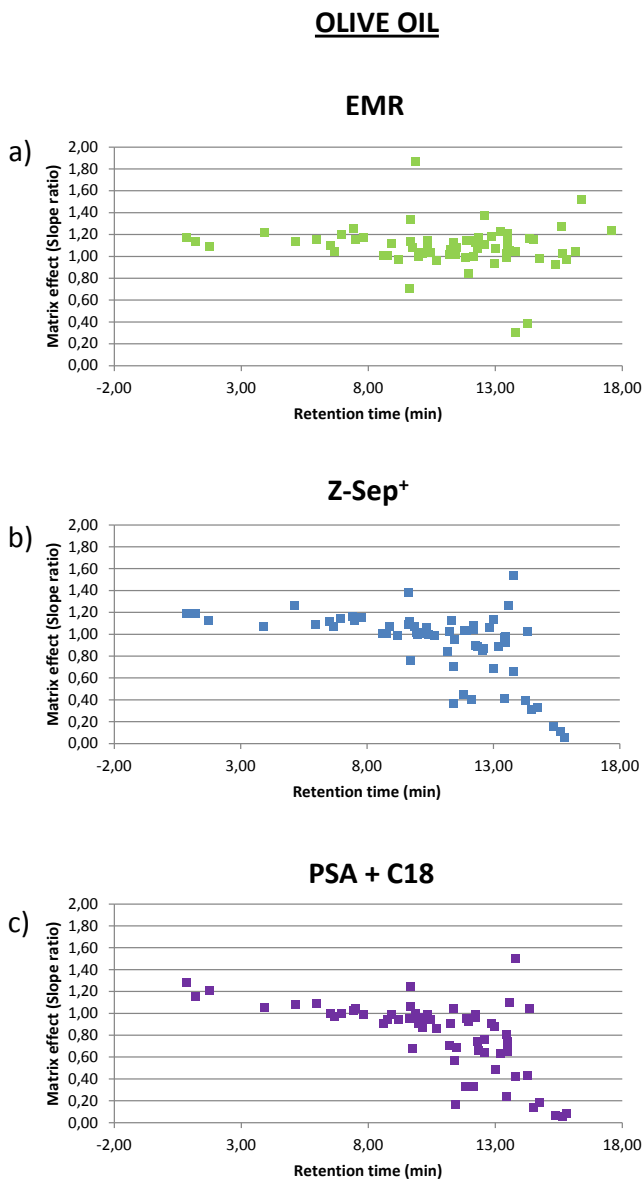


Figure III.4: 2D Plot of the matrix effects of the species (expressed as calibration curves slope ratio) versus retention times for olive oil with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid; (b) Z-Sep<sup>+</sup>; (c) PSA+C18.

Table III.4: Recovery rates (RR), RSD ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and matrix effects (ME) in the determination of pesticides in olive oil samples employing different sorbents from previous literature

	Proposed EMR-Lipid method			PSA+C18 (Polgar et al., 2012)			Z-Sep+ (Moreno et al., 2014)		
	RR (%)	RSD (%)	ME (%)	RR (%)	RSD (%)	ME (%)	RR (%)	RSD (%)	ME (%)
Acephate	94	9	14	53	17	6	-	-	-
Azinphos-methyl	80	10	15	94	19	129	-	-	-
Carbaryl	90	3	2	89	6	-27	93	5	-23
Carbendazim	82	4	22	86	7	5	96	3	-19
Carbofuran	77	2	8	87	3	-43	99	3	-20
Chlorfenvinphos	90	6	22	87	4	4	-	-	-
Diazinon	102	14	4	71	11	8	-	-	-
Dimethoate	91	5	15	95	6	-46	-	-	-
Fenhexamid	72	14	13	76	5	-9	-	-	-
Imidacloprid	96	6	25	93	10	11	-	-	-
Kresoxim-methyl	102	3	7	78	18	-2	-	-	-
Malathion	72	16	-7	90	4	25	-	-	-
Metalaxyl	108	5	15	103	4	12	-	-	-
Methamidophos	67	7	17	72	11	25	-	-	-
Methidathion	83	8	12	89	3	51	-	-	-
Methomyl	96	5	13	104	5	-30	96	4	13
Monocrotophos	87	4	15	73	19	-49			
Omethoate	78	5	9	76	14	26	-	-	-
Pirimiphos-methyl	77	4	-1	70	7	30	-	-	-
Spinosyn A	106	5	5	43	7	-39	-	-	-
Spinosyn D	118	5	-1	46	9	-24	-	-	-
Tebuconazole	83	4	7	87	5	13	-	-	-
Thiacloprid	90	2	1	91	3	-12	-	-	-

### Olives

Unlike olive oil, in which satisfactory results were obtained in terms of recovery rates and matrix effects for most analytes regardless the sorbent used, the results in olives are definitely worst, due to the challenging composition of this matrix. Additional studies should be conducted to further improve clean-up methodologies, or alternatively, in the mean time, use higher

dilution factors to minimize matrix effects although at the expense of method performance. A similar comment applies also to avocado matrix. The detailed results for olives are included in table III.5 and summarized in figure III.5. In this case, EMR-Lipid and Z-Sep sorbents showed the best recoveries rates (70-120%). The number of recovered compounds was similar in both cases (45 for Z-Sep and 47 for EMR-Lipid) with better overall precision in the case of EMR-Lipid, with RSD less than 10% for 52 pesticides, whereas average RSD > 10% were obtained for Z-Sep. On the other hand, due to the high complexity of this matrix, the matrix effects using the three different sorbents were higher than 40% for most of the analytes. EMR-Lipid and Z-Sep sorbents showed a soft matrix effect lower than 20% for 11 and 19 compounds respectively. Nevertheless, the number of species that have moderate matrix effects (20-40%) was higher when EMR-Lipid was employed (figure III.5). The results in terms of matrix effects are particularly worst for the late eluting compounds. The 2D-plots with matrix effects mapped against retention time evidences the lack of cleanliness of the extracts as probably this significant signal suppression can be attributed to coeluting co-extracted lipids that hamper the ionization of the more lipophilic (apolar) pesticides (figure III.6).

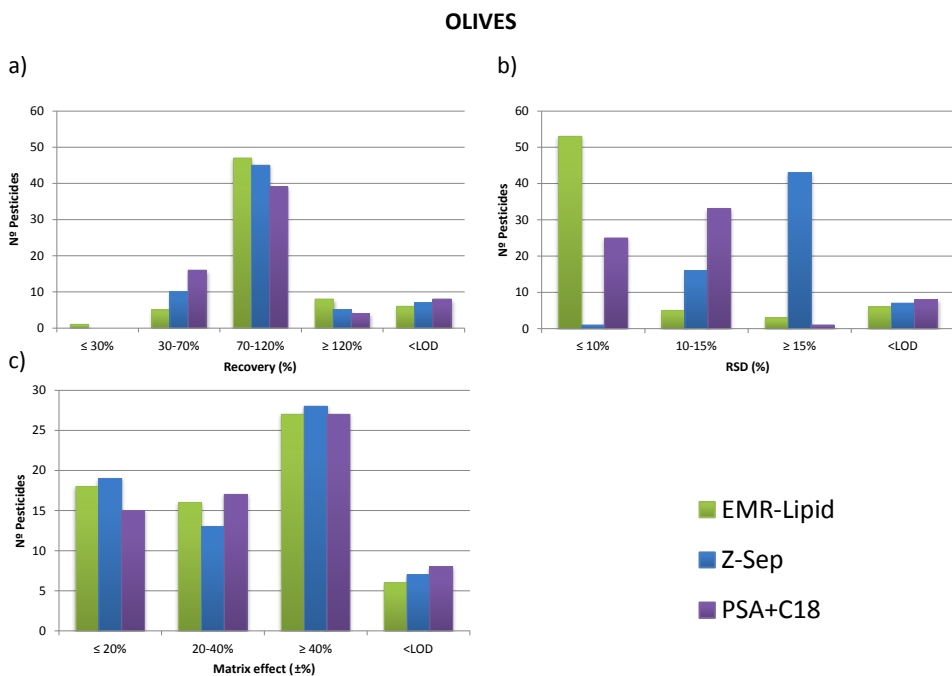


Figure III.5: Graphical performance of the results obtained in olives: (a) recovery rates; (b) RSD and; (c) matrix effects

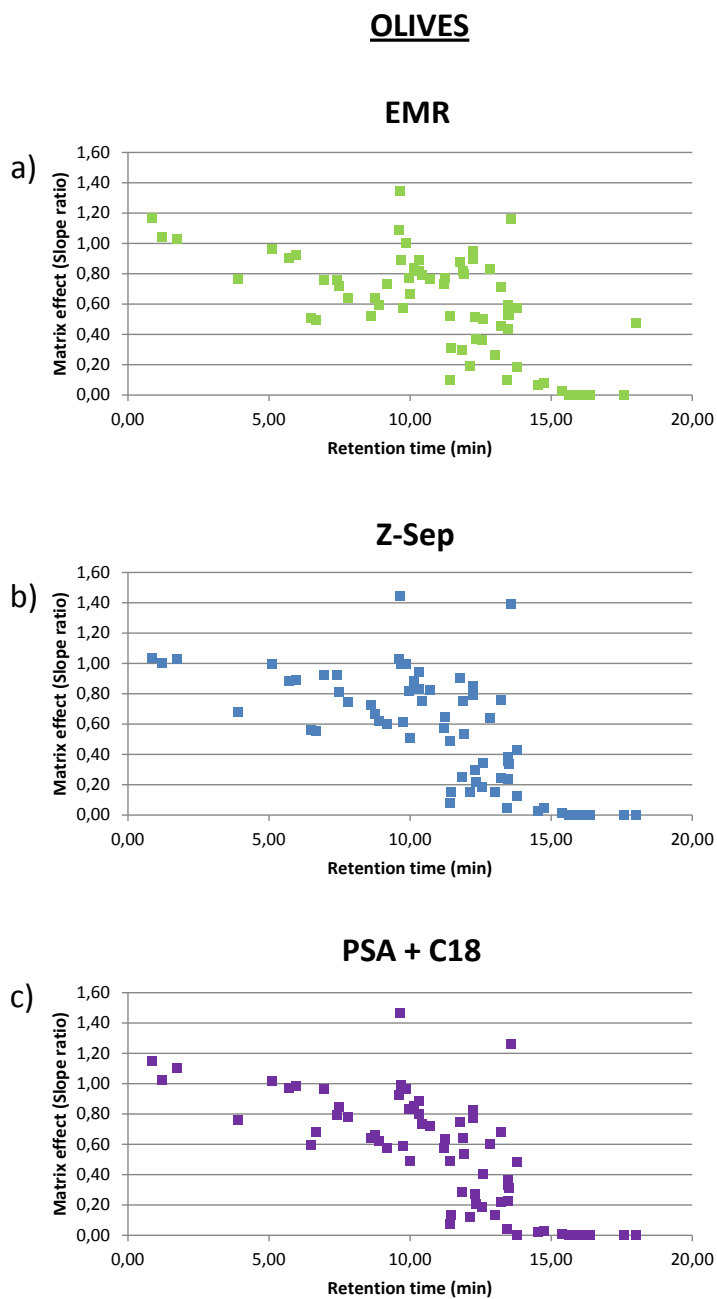


Figure III.6: 2D-Plot of the matrix effects of the species/retention time in olives with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid; (b) Z-Sep and; (c) PSA+C18

Table III.5: Recovery rates (RR), RSD (n=6) and matrix effects (ME) for each sorbent in olives.

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
Acephate	73.4	5.5	1.04 (+4%)	82.7	20.7	1.00 (0%)	69.7	10.4	1.03 (+3%)
	98.2	11.7							
Acetamiprid	82.6	6.1	0.64 (-36%)	81.9	23.1	0.75 (-25%)	81.6	12.1	0.78 (-22%)
	97.7	8.2							
Alachlor	90.9	7.3	0.83 (-17%)	77.8	12.6	0.64 (-36%)	78.8	12.3	0.60 (-40%)
	133.3	4.8							
Amitraz	70.7	6.1	0.90 (-10%)	66.4	15.8	0.89 (-11%)	37.6	11.6	0.97 (-3%)
	< LOD	12.0							
Atrazine	73.2	6.5	0.67 (-33%)	66.5	16.2	0.51 (49%)	65.2	8.1	0.49 (-51%)
	99.1	8.1							
Avermectin B1a	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Azinphos-methyl	96.4	5.6	0.82 (-18%)	95.3	14.8	0.75 (-25%)	87.5	10.3	0.64 (-36%)
	< LOD	-							
Azoxystrobin	91.0	7.2	0.89 (-11%)	96.8	15.5	0.79 (-21%)	91.5	10.4	0.77 (-23%)
	113.2	4.4							
Benalaxyl	104.8	5.6	0.59 (-41%)	86.5	12.9	0.38 (-62%)	82.2	9.6	0.36 (-64%)
	129.2	9.8							
Buprofezin	108.8	7.0	0.50 (-50%)	124.7	9.6	0.34 (-66%)	124.0	9.3	0.40 (-60%)
	123.1	8.2							
Carbaryl	86.1	7.8	0.83 (-17%)	89.0	15.6	0.88 (-12%)	82.0	11.2	0.85 (-15%)
	104.4	7.0							
Carbendazim	71.3	6.4	0.76 (-24%)	70.6	15.6	0.68 (-32%)	67.8	10.3	0.76 (-24%)
	67.9	11.2							
Carbofuran	111.0	6.2	0.57 (-43%)	114.4	16.6	0.62 (-38%)	92.1	9.8	0.59 (-41%)
	131.2	2.1							
Carfentrazone-ethyl	136.2	7.9	0.52 (-48%)	97.3	20.0	0.33 (-67%)	106.2	10.1	0.31 (-69%)
	149.0	13.3							
Chlorfenvinphos	128.6	6.7	0.45 (-55%)	87.2	11.0	0.24 (-76%)	97.1	12.5	0.22 (-78%)
	129.2	8.6							
Chlorotoluron	82.7	6.6	0.77	80.7	15.1	0.82	79.6	9.9	0.83

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
	80.3	7.2	(-23%)			(-18%)			(-17%)
Chlorpyrifos	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Chlorpyrifos-methyl	12.7	15.3	0.47 (-53%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Diazinon	131.6	8.8	0.57 (-43%)	108.8	19.4	0.43 (-57%)	86.8	12.8	0.48 (-52%)
	< LOD	-							
Difenoconazole	115.5	12.7	0.10 (-90%)	84.5	16.5	0.05 (-95%)	88.2	6.3	0.04 (-98%)
	< LOD	-							
Diflufenican	135.9	15.0	0.06 (-94%)	107.3	26.2	0.03 (-97%)	147.7	8.9	0.02 (-98%)
	< LOD	-							
Dimethoate	89.2	6.2	0.72 (-28%)	88.0	18.6	0.81 (-19%)	86.4	9.9	0.85 (-15%)
	102.8	7.8							
Dimethomorph	94.3	7.5	0.73 (-27%)	104.5	19.0	0.57 (-43%)	83.5	9.2	0.57 (-63%)
	107.16	8.3							
Diuron	77.0	5.8	0.79 (-21%)	83.4	14.7	0.75 (-25%)	78.6	12.7	0.73 (-27%)
	< LOD	-							
Dodine	49.4	15.7	0.09 (-91%)	94.0	39.5	0.08 (-92%)	41.8	12.6	0.07 (-93%)
	< LOD	-							
Ethion	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Etofenprox	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Fenamiphos	102.1	5.4	0.79 (-21%)	88.9	15.2	0.53 (-47%)	81.0	8.9	0.54 (-46%)
	115.5	11.2							
Fenamiphos-sulfone	106.1	8.9	1.34 (+34%)	107.9	17.9	1.44 (+44%)	90.9	12.5	1.47 (+47%)
	91.1	12.6							
Fenhexamid	82.4	6.1	0.95 (-5%)	84.3	13.3	0.85 (-15%)	69.3	12.3	0.83 (-17%)
	97.9	11.6							
Fenthion	118.6	8.6	0.18 (-82%)	132.7	15.1	0.12 (-88%)	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Fenthion-	83.3	9.8	1.00	95.5	17.7	0.99	75.3	11.4	0.96

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
sulfoxide	90.1	7.3	(0%)			(-1%)			(-4%)
Flufenoxuron	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Imidacloprid	79.3	8.4	0.76 (-24%)	94.2	21.8	0.92 (-8%)	77.9	12.4	0.79 (-21%)
	99.5	11.3							
Isoproturon	87.2	6.8	0.82 (-18%)	86.8	15.7	0.83 (-17%)	86.6	10.0	0.80 (+20%)
	< LOD	-							
Kresoxim-methyl	106.7	7.2	0.53 (-47%)	97.8	14.5	0.35 (-65%)	109.7	11.6	0.33 (-67%)
	161.3	5.0							
Malaoxon	74.5	7.9	0.89 (-11%)	54.8	18.6	0.99 (-1%)	60.5	13.0	0.99 (-1%)
	67.6	9.5							
Malathion	92.3	5.6	0.71 (-29%)	92.2	10.0	0.76 (-24%)	87.3	9.5	0.68 (-32%)
	124.6	4.5							
Metalaxyl	92.0	6.7	0.89 (-11%)	93.0	17.5	0.94 (-6%)	89.0	10.5	0.88 (-12%)
	86.7	8.8							
Methamidophos	61.5	7.0	1.16 (+16%)	70.0	16.4	1.04 (+4%)	65.9	9.3	1.15 (+15%)
	< LOD	16.4							
Methidathion	85.7	12.7	0.87 (-13%)	85.2	21.5	0.90 (-10%)	80.2	8.8	0.75 (-25%)
	< LOD	-							
Methomyl	85.7	5.3	0.96 (-4%)	65.7	16.8	0.99 (-1%)	77.2	13.3	1.02 (+2%)
	100.8	7.3							
Monocrotophos	89.4	7.1	0.92 (-8%)	87.4	19.9	0.89 (-11%)	84.0	12.4	0.98 (-2%)
	97.1	10.5							
Norflurazon	90.0	8.9	0.76 (24%)	98.4	19.9	0.82 (-18%)	87.4	10.6	0.72 (-28%)
	93.5	11.1							
Omethoate	80.3	6.6	1.03 (+3%)	80.7	19.3	1.03 (+3%)	75.6	11.6	1.10 (+10%)
	85.9	10.2							
Paclobutrazol	77.4	6.7	0.77 (-23%)	81.9	14.1	0.64 (+36%)	77.1	9.8	0.63 (-37%)
	< LOD	-							
Penconazole	83.3	7.9	0.36 (-64%)	70.1	13.8	0.18 (-82%)	66.4	10.1	0.18 (-82%)
	114.8	10.3							
Phosmet	513.40	9.4	0.19	508.9	16.5	0.15	502.3	6.7	0.12

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
	< LOD	-	(-81%)			(-85%)			(-88%)
Pirimiphos-methyl	93.0	6.7	1.16 (+16%)	84.2	14.1	1.39 (+39%)	88.7	10.7	1.26 (+26%)
	101.5	6.6							
Propargite	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Pyrimethanil	48.0	6.1	0.59 (-41%)	51.3	15.0	0.62 (-38%)	51.5	8.8	0.62 (-38%)
	67.5	7.5							
Pyriproxifen	205.82	13.9	0.02 (-98%)	201.4	26.7	0.01 (-99%)	162.8	7.2	0.01 (-99%)
	< LOD	-							
Quinalphos	112.5	6.6	0.43 (-57%)	84.3	18.9	0.24 (-76%)	85.8	10.4	0.22 (-78%)
	115.6	9.8							
Quinmerac	49.0	8.8	0.75 (-25%)	34.1	13.8	0.92 (-8%)	35.8	18.3	0.97 (-3%)
	< LOD	-							
Quizalofop-p-ethyl	130.1	9.9	0.08 (-92%)	87.5	19.7	0.04 (-96%)	121.9	10.5	0.03 (-97%)
	< LOD	-							
Rotenone	120.0	5.2	0.26 (-74%)	99.1	13.9	0.15 (-85%)	103.6	9.3	0.13 (-87%)
	< LOD	-							
Simazine	71.4	6.0	0.64 (-36%)	72.5	15.7	0.67 (-33%)	70.3	9.2	0.66 (-34%)
	89.9	9.7							
Spinosyn A	115.9	4.5	0.52 (-48%)	100.9	21.3	0.49 (-51%)	39.1	9.4	0.49 (-51%)
	144.5	11.4							
Spinosyn D	126.2	9.3	0.29 (-71%)	117.0	13.2	0.25 (-75%)	45.0	11.1	0.28 (-72%)
	< LOD	-							
Tebuconazole	93.6	6.0	0.51 (-49%)	76.6	13.6	0.30 (-70%)	73.9	8.4	0.27 (-73%)
	< LOD	-							
Terbutylazine	76.2	11.7	0.31 (-69%)	59.4	15.6	0.15 (-85%)	60.5	8.5	0.13 (-87%)
	112.2	13.9							
Terbutylazine-desethyl	80.3	6.3	0.73 (-27%)	69.4	12.9	0.60 (-40%)	69.9	9.1	0.57 (-43%)
	104.3	7.3							
Tetraconazole	117.5	5.7	0.37 (-63%)	95.4	15.8	0.22 (-78%)	88.5	9.1	0.21 (-79%)
	186.0	7.6							
Thiacloprid	88.1	6.4	0.52	86.4	22.4	0.73	81.4	13.4	0.64

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
	100.1	8.9	(-48%)			(-27%)			(-36%)
Thiamethoxam	78.6	13.5	0.51 (-49%)	107.7	26.2	0.56 (-44%)	80.5	11.8	0.59 (-41%)
	< LOD	-							
Thiophanate-methyl	66.1	6.0	1.09 (+9%)	54.3	19.2	1.03 (+3%)	48.1	10.9	0.93 (-7%)
	< LOD	-							
Trichlorfon	93.5	6.7	0.49 (-51%)	271.6	24.3	0.55 (45%)	81.2	8.9	0.68 (-32%)
	< LOD	-							
<sup>a</sup> The upper level corresponds to 100 µg·kg <sup>-1</sup> and the lower level corresponds to 10 µg·kg <sup>-1</sup>									
<sup>b</sup> 100 µg·kg <sup>-1</sup>									

### Avocado

For avocado samples, the obtained results (table III.6) concluded that the use of PSA + C18 recovered fewer pesticides than EMR-Lipid and Z-Sep sorbents (50 versus 47 and 43 respectively). However, the reproducibility values were inadequate for most compounds. The 60 % of compounds have a RSD higher than 15 % (figure III.7). For Z-Sep and EMR-Lipid sorbents, RSD lower than 10% were achieved for most compounds. So, these sorbents remove more efficiently the co-extractants, which could have a great impact in the reproducibility. Concerning the matrix effect, 34 pesticides showed values minor than 20% when EMR-Lipid was used whereas 30 pesticides in the case of Z-Sep at the same time, less analytes beyond 40%. These data are summarized in figure III.7. Thus, EMR-Lipid was found the more appropriate sorbent, provided the compromise between reproducibility and extraction efficiency. Likewise in olives, although not in such as extent, matrix effects were particularly relevant for the late eluting analytes (figure III.8), with suppression higher than 50 % for most of the compounds eluting in the last part of the chromatogram, which suggests that extract clean-up with the different sorbent tested were not effective in avocado as it was in olive oil.

## AVOCADO

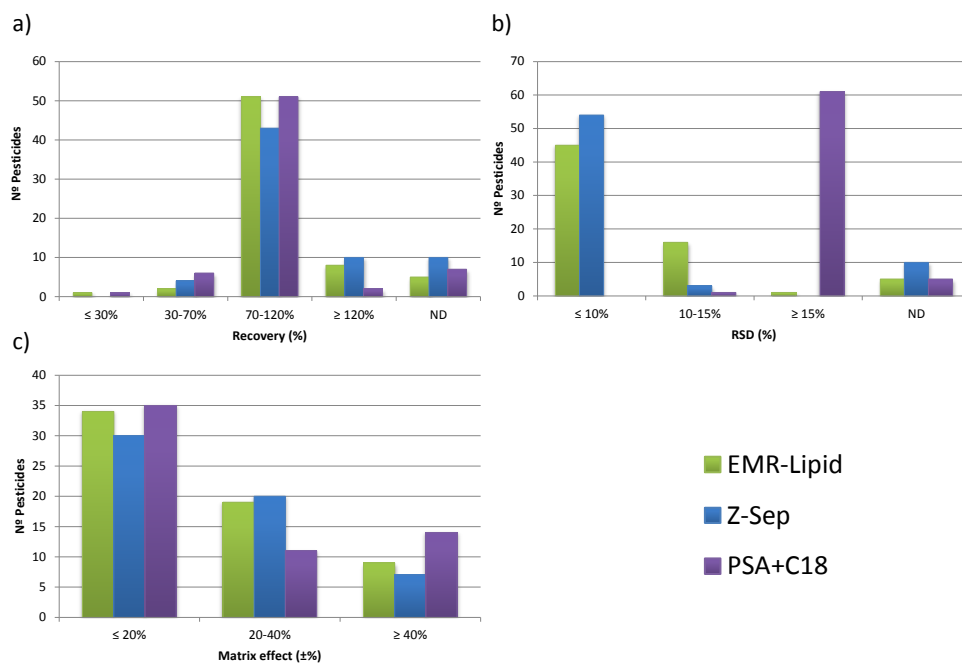


Figure III.7: Graphical performance of the results obtained in avocado: (a) recovery rates; (b) RSD and; (c) matrix effects

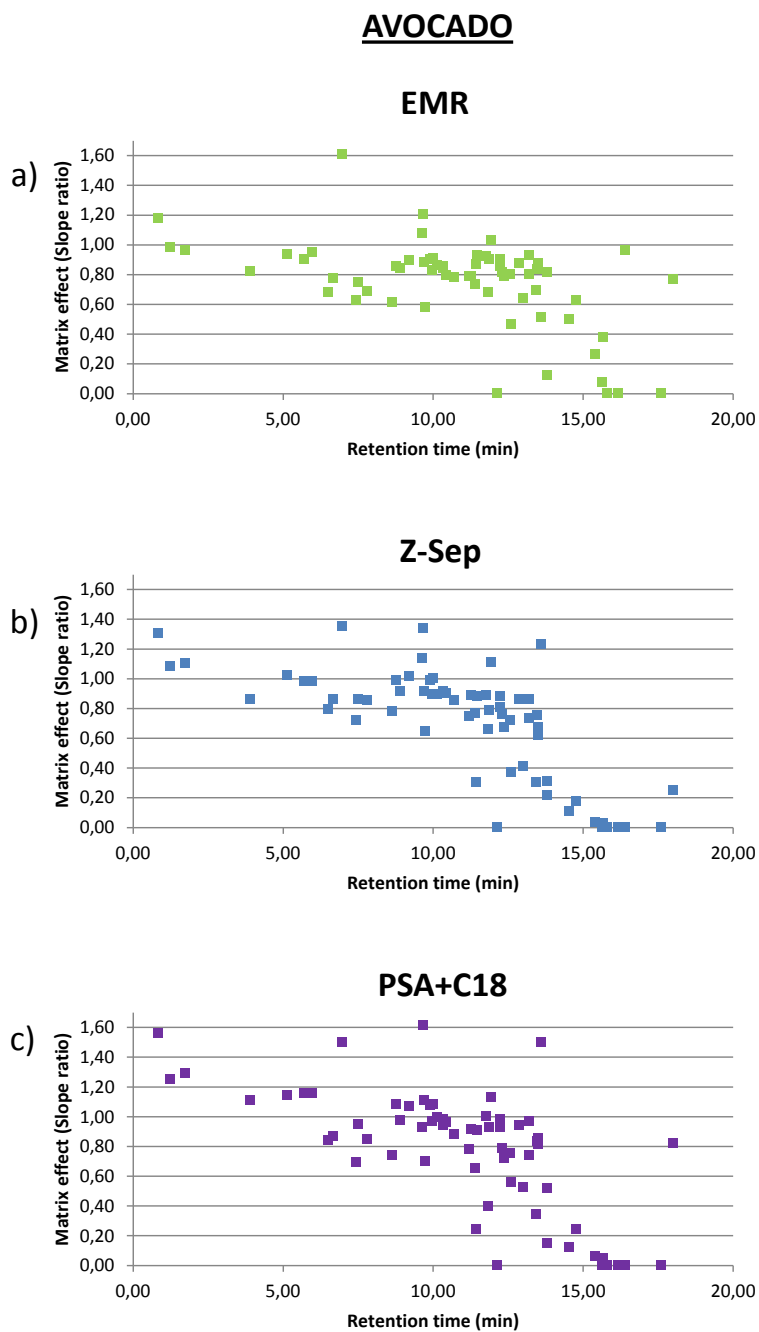


Figure III.8: 2D Plot of the matrix effects of the species/retention time in avocado with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid; (b) Z-Sep; (c) PSA+C18

Table III.6: Recovery rates (RR), RSD (n=6) and matrix effects for each sorbent in avocado

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18																																																																																																																																																																												
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)																																																																																																																																																																										
Acephate	72.7	6.1	0.98 (-2%)	87.3	5.5	1.09 (+9%)	74.7	25.1	1.25 (+25%)																																																																																																																																																																										
	109.8	13.2								Acetamiprid	95.0	8.4	0.69 (-31%)	99.6	6.6	0.86 (-14%)	89.7	29.8	0.85 (-15%)	92.0	16.0	Alachlor	99.0	9.7	0.88 (-12%)	99.5	7.8	0.86 (-14%)	85.2	27.4	0.94 (-6%)	< LOD	-	Amitraz	82.6	5.4	0.91 (-9%)	80.7	5.3	0.98 (-2%)	41.7	27.4	1.16 (+16%)	< LOD	-	Atrazine	101.4	8.1	0.91 (-9%)	98.4	5.6	1.00 (0%)	88.3	24.2	1.08 (+8%)	< LOD	-	Avermectin B1a	127.3	3.7	0.97 (-3%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	Azinphos- methyl	111.3	10.7	0.90 (-10%)	120.2	8.8	0.79 (-21%)	88.1	23.0	0.93 (-7%)	123.4	16.9	Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)	77.3	10.7	Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8
Acetamiprid	95.0	8.4	0.69 (-31%)	99.6	6.6	0.86 (-14%)	89.7	29.8	0.85 (-15%)																																																																																																																																																																										
	92.0	16.0								Alachlor	99.0	9.7	0.88 (-12%)	99.5	7.8	0.86 (-14%)	85.2	27.4	0.94 (-6%)	< LOD	-	Amitraz	82.6	5.4	0.91 (-9%)	80.7	5.3	0.98 (-2%)	41.7	27.4	1.16 (+16%)	< LOD	-	Atrazine	101.4	8.1	0.91 (-9%)	98.4	5.6	1.00 (0%)	88.3	24.2	1.08 (+8%)	< LOD	-	Avermectin B1a	127.3	3.7	0.97 (-3%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	Azinphos- methyl	111.3	10.7	0.90 (-10%)	120.2	8.8	0.79 (-21%)	88.1	23.0	0.93 (-7%)	123.4	16.9	Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)	77.3	10.7	Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97				
Alachlor	99.0	9.7	0.88 (-12%)	99.5	7.8	0.86 (-14%)	85.2	27.4	0.94 (-6%)																																																																																																																																																																										
	< LOD	-								Amitraz	82.6	5.4	0.91 (-9%)	80.7	5.3	0.98 (-2%)	41.7	27.4	1.16 (+16%)	< LOD	-	Atrazine	101.4	8.1	0.91 (-9%)	98.4	5.6	1.00 (0%)	88.3	24.2	1.08 (+8%)	< LOD	-	Avermectin B1a	127.3	3.7	0.97 (-3%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	Azinphos- methyl	111.3	10.7	0.90 (-10%)	120.2	8.8	0.79 (-21%)	88.1	23.0	0.93 (-7%)	123.4	16.9	Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)	77.3	10.7	Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																
Amitraz	82.6	5.4	0.91 (-9%)	80.7	5.3	0.98 (-2%)	41.7	27.4	1.16 (+16%)																																																																																																																																																																										
	< LOD	-								Atrazine	101.4	8.1	0.91 (-9%)	98.4	5.6	1.00 (0%)	88.3	24.2	1.08 (+8%)	< LOD	-	Avermectin B1a	127.3	3.7	0.97 (-3%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	Azinphos- methyl	111.3	10.7	0.90 (-10%)	120.2	8.8	0.79 (-21%)	88.1	23.0	0.93 (-7%)	123.4	16.9	Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)	77.3	10.7	Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																												
Atrazine	101.4	8.1	0.91 (-9%)	98.4	5.6	1.00 (0%)	88.3	24.2	1.08 (+8%)																																																																																																																																																																										
	< LOD	-								Avermectin B1a	127.3	3.7	0.97 (-3%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	Azinphos- methyl	111.3	10.7	0.90 (-10%)	120.2	8.8	0.79 (-21%)	88.1	23.0	0.93 (-7%)	123.4	16.9	Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)	77.3	10.7	Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																								
Avermectin B1a	127.3	3.7	0.97 (-3%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-																																																																																																																																																																										
	< LOD	-								Azinphos- methyl	111.3	10.7	0.90 (-10%)	120.2	8.8	0.79 (-21%)	88.1	23.0	0.93 (-7%)	123.4	16.9	Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)	77.3	10.7	Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																				
Azinphos- methyl	111.3	10.7	0.90 (-10%)	120.2	8.8	0.79 (-21%)	88.1	23.0	0.93 (-7%)																																																																																																																																																																										
	123.4	16.9								Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)	77.3	10.7	Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																
Azoxystrobin	96.9	6.1	0.86 (-14%)	116.1	4.8	0.88 (-12%)	106.5	26.0	0.98 (-2%)																																																																																																																																																																										
	77.3	10.7								Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)	86.7	15.8	Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																												
Benalaxyl	107.0	10.6	0.83 (-17%)	106.9	5.8	0.76 (-24%)	101.4	27.3	0.84 (-16%)																																																																																																																																																																										
	86.7	15.8								Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)	134.8	13.7	Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																								
Buprofezin	154.2	4.5	0.46 (-54%)	240.5	9.2	0.37 (-63%)	83.7	59.2	0.56 (-64%)																																																																																																																																																																										
	134.8	13.7								Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)	< LOD	-	Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																																				
Carbaryl	102.3	9.7	0.86 (-14%)	100.2	6.8	0.90 (-10%)	88.3	23.1	1.00 (0%)																																																																																																																																																																										
	< LOD	-								Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)	91.0	13.0	Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																																																
Carbendazim	93.0	8.4	0.82 (-18%)	93.7	5.6	0.86 (-14%)	81.2	26.4	1.11 (+11%)																																																																																																																																																																										
	91.0	13.0								Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)	121.1	8.9	Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																																																												
Carbofuran	134.7	6.5	0.58 (-42%)	106.7	6.9	0.65 (-35%)	82.9	21.1	0.70 (-30%)																																																																																																																																																																										
	121.1	8.9								Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)	120.6	10.1	Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																																																																								
Carfentrazone- ethyl	115.1	11.9	0.84 (-16%)	112.4	6.6	0.68 (-32%)	94.1	26.2	0.84 (-16%)																																																																																																																																																																										
	120.6	10.1								Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)	112.5	14.6	Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																																																																																				
Chlorfenvinphos	105.4	10.7	0.80 (-20%)	93.9	5.8	0.74 (-26%)	90.0	27.6	0.74 (-26%)																																																																																																																																																																										
	112.5	14.6								Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																																																																																																
Chlorotoluron	103.8	9.0	0.83	104.1	5.2	0.90	92.9	26.9	0.97																																																																																																																																																																										

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
	87.2	17.6	(-17%)			(-10%)			(-3%)
Chlorpyrifos	156.1	8.6	0.38	145.9	17.3	0.03	145.9	15.7	0.05
	< LOD	-	(-62%)						
Chlorpyrifos-methyl	96.2	8.7	0.77	145.9	8.7	0.25	111.1	21.3	0.82
	104.6	19.6	(-23%)						
Diazinon	131.2	3.8	0.12	214.2	14.0	0.22	119.6	42.5	0.15
	134.6	10.1	(-88%)						
Difenoconazole	100.9	13.4	0.69	105.7	4.7	0.31	94.7	25.5	0.35
	< LOD	-	(-31%)						
Diflufenican	116.3	6.6	0.50	150.4	5.1	0.11	110.9	24.4	0.12
	< LOD	-	(-50%)						
Dimethoate	107.1	8.2	0.75	103.2	4.5	0.87	93.9	25.3	0.95
	103.4	13.8	(-25%)						
Dimethomorph	103.2	9.6	0.79	100.8	5.4	0.75	91.8	24.6	0.79
	82.0	13.0	(-21%)						
Diuron	102.8	8.3	0.80	98.9	5.8	0.91	85.5	24.5	0.96
	< LOD	-	(20%)						
Dodine	26.0	24.4	0.87	143.0	11.0	0.31	48.0	24.0	0.25
	< LOD	-	(-13%)						
Ethion	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
Etofenprox	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
Fenamiphos	111.3	9.0	1.03	96.6	5.4	1.11	97.0	27.2	1.13
	75.0	22.8	(+3%)						
Fenamiphos-sulfone	63.4	11.2	1.21	52.8	6.0	1.34	44.1	24.6	1.61
	< LOD	-	(+21%)						
Fenhexamid	106.8	8.3	0.90	104.7	5.8	0.81	89.8	23.6	0.93
	< LOD	-	(-10%)						
Fenthion	91.4	13.1	0.82	137.2	14.2	0.31	86.8	21.3	0.52
	< LOD	-	(-18%)						
Fenthion-	84.9	11.2	0.90	95.4	5.0	0.99	80.3	26.0	1.08

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
sulfoxide	71.5	18.3	(-10%)			(-1%)			(+8%)
Flufenoxuron	101.5	12.8	0.07 (93%)	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Imidacloprid	91.0	9.2	0.63 (-37%)	90.5	3.5	0.73 (-27%)	80.4	24.7	0.69 (-31%)
	101.0	12.1							
Isoproturon	109.0	9.7	0.85 (-15%)	105.7	5.6	0.90 (-10%)	99.2	26.7	0.94 (6%)
	< LOD	-							
Kresoxim-methyl	118.7	6.9	0.83 (-17%)	133.2	4.4	0.64 (-36%)	110.1	27.8	0.86 (+14%)
	< LOD	-							
Malaoxon	82.1	10.5	0.88 (-12%)	46.7	6.3	0.92 (-8%)	41.7	27.3	1.11 (+11%)
	84.5	15.5							
Malathion	95.0	12.3	0.93 (-7%)	107.4	7.0	0.86 (-14%)	91.5	27.3	0.97 (-3%)
	119.1	12.8							
Metalaxyl	110.3	9.3	0.86 (-14%)	105.6	5.0	0.91 (-9%)	97.1	24.9	0.98 (-2%)
	77.2	18.6							
Methamidophos	65.0	7.1	1.18 (+18% )	86.0	5.8	1.31 (+31%)	76.9	26.5	1.56 (+56%)
	< LOD	-							
Methidathion	105.1	9.5	0.92 (-8%)	104.4	7.8	0.89 (-11%)	93.5	23.4	1.00 (0%)
	< LOD	-							
Methomyl	99.8	9.2	0.94 (-6%)	99.9	6.0	1.02 (+2%)	88.2	25.8	1.14 (+14%)
	107.4	14.8							
Monocrotophos	100.5	8.2	0.95 (-5%)	92.8	5.3	0.99 (-1%)	80.4	27.3	1.16 (+16%)
	88.8	18.3							
Norflurazon	107.3	9.8	0.79 (-21%)	105.8	5.6	0.86 (-14%)	94.5	28.7	0.88 (-12%)
	93.8	16.8							
Omethoate	83.4	7.0	0.96 (-4%)	82.7	5.3	1.11 (+11%)	73.0	24.2	1.29 (+29%)
	80.8	16.7							
Paclobutrazol	108.6	9.8	0.79 (-21%)	105.1	6.8	0.89 (-11%)	94.1	26.7	0.92 (-8%)
	96.6	13.3							
Penconazole	91.4	9.5	0.80 (-20%)	86.1	5.2	0.72 (-28%)	79.7	27.8	0.75 (-25%)
	93.9	12.7							
Phosmet	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
	< LOD	-							
Pirimiphos-methyl	116.1	8.4	0.51 (-49%)	139.6	6.3	1.23 (+23%)	104.0	29.6	1.50 (+50%)
	117.1	16.3							
Propargite	< LOD	-	-	< LOD	-	-	< LOD	-	-
	< LOD	-							
Pyrimethanil	92.2	8.4	0.84 (-16%)	92.4	5.6	0.92 (-8%)	84.2	26.2	0.98 (-2%)
	93.9	14.8							
Pyriproxifen	194.3	15.3	0.27 (-73%)	328.6	6.0	0.04 (-96%)	164.1	29.9	0.06 (-94%)
	< LOD	-							
Quinalphos	110.9	11.9	0.88 (-22%)	121.3	6.6	0.62 (-38%)	103.8	29.7	0.82 (-18%)
	96.8	17.0							
Quinmerac	84.8	9.5	1.61 (+61%)	63.0	9.4	1.35 (+35%)	12.3	32.7	1.50 (+50%)
	< LOD	-							
Quizalofop-p-ethyl	110.2	7.9	0.63 (-37%)	156.3	4.0	0.18 (-82%)	111.6	22.9	0.24 (-76%)
	< LOD	-							
Rotenone	109.4	10.1	0.64 (-36%)	142.5	3.8	0.42 (-58%)	100.5	24.9	0.53 (-47%)
	< LOD	-							
Simazine	99.8	8.0	0.86 (-14%)	97.4	5.3	0.99 (-1%)	86.0	23.2	1.09 (+9%)
	< LOD	-							
Spinosyn A	134.4	10.0	0.73 (-27%)	101.1	6.4	0.77 (-23%)	65.1	24.0	0.65 (-35%)
	< LOD	-							
Spinosyn D	135.1	5.5	0.68 (-32%)	115.6	5.8	0.66 (-34%)	71.1	22.5	0.40 (-60%)
	< LOD	-							
Tebuconazole	97.2	11.0	0.82 (-18%)	96.7	6.2	0.76 (-24%)	91.6	25.9	0.79 (-21%)
	< LOD	-							
Terbuthylazine	109.9	9.4	0.93 (-7%)	102.2	6.0	0.88 (-12%)	91.0	26.1	0.91 (-8%)
	106.3	15.6							
Terbuthylazine-desethyl	100.9	8.2	0.90 (-10%)	94.2	6.6	1.02 (+2%)	84.4	24.4	1.07 (+7%)
	104.9	13.0							
Tetraconazole	103.9	12.4	0.79 (-21%)	103.4	4.8	0.67 (-33%)	94.1	25.7	0.72 (-28%)
	115.6	14.3							
Thiacloprid	96.1	8.9	0.61	98.1	4.8	0.78	83.7	28.3	0.74

	EMR-Lipid			Z-Sep			PSA + C18		
	RR <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)	RR <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	ME (%)
	< LOD	-	(-39%)			(-22%)			(-26%)
Thiamethoxam	96.5	9.4	0.68	107.6	4.1	0.80	76.8	25.8	0.85
	85.7	18.9	(-32%)						
Thiophanate-methyl	80.5	5.8	1.08	32.5	12.0	1.14	30.7	32.8	0.93
	< LOD	-	(+8%)						
Trichlorfon	115.1	9.5	0.78	110.5	5.9	0.87	90.6	14.1	0.87
	124.0	12.1	(-22%)						
<sup>a</sup> The upper level corresponds to 100 µg·kg <sup>-1</sup> and the lower level corresponds to 10 µg·kg <sup>-1</sup>									
<sup>b</sup> 100 µg·kg <sup>-1</sup>									

### III.1.3.3.- Analytical performance

Once EMR-Lipid was selected as dSPE sorbent, the linearity of the calibration curves and limits of quantitation (LOQ) were studied by UHPLC-MS/MS analysis for the three matrices studied. The response function was found to be linear with a regression coefficient higher than 0.996 in the tested range for all compounds, as could be observed in table III.7. LOQs were assigned taking into account signal-to-noise (S/N) ratio criterion (S/N of about 10 for LOQ). MRLs have been established in pesticides for avocado and olives samples (Reglamento (CE) 396/2005; Reglamento (CE) 149/2008). According to the legislation, in the case of olive oil the MRL is set by a correction factor of 5 with respect MRL established in olives for olive oil production (Reglamento (UE) 400/2014). These MRLs have been included in table III.7. These LOQs were always lower than 94 µg kg<sup>-1</sup>, being in compliance with current EU MRLs, except fenthion, with poor data probably due to partial degradation. Therefore, the proposed method could be employed for the determination of very low levels of these compounds in the selected matrices. As an example, extracted ion chromatograms of selected pesticides in olive oil extracts spiked at 5 µg·kg<sup>-1</sup> using EMR-Lipid sorbent are shown in figure III.9. In addition, a chromatogram of olive oil extract using EMR-Lipid sorbent is provided in figure III.10.

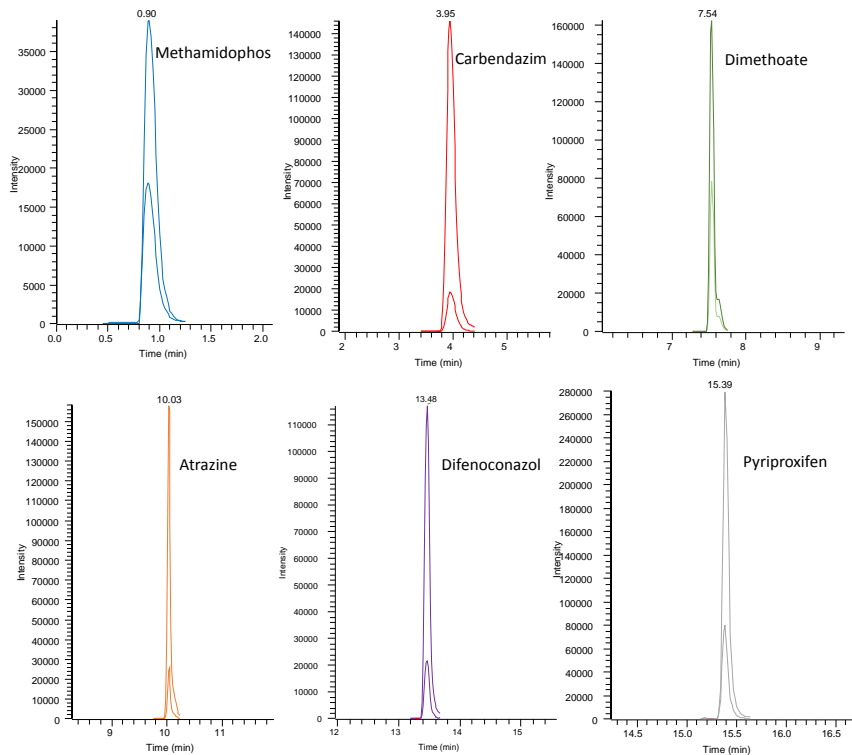


Figure III.9: Extracted ion chromatograms of selected pesticides in olive oil extracts spiked at 5 µg·kg<sup>-1</sup> using EMR-Lipid sorbent

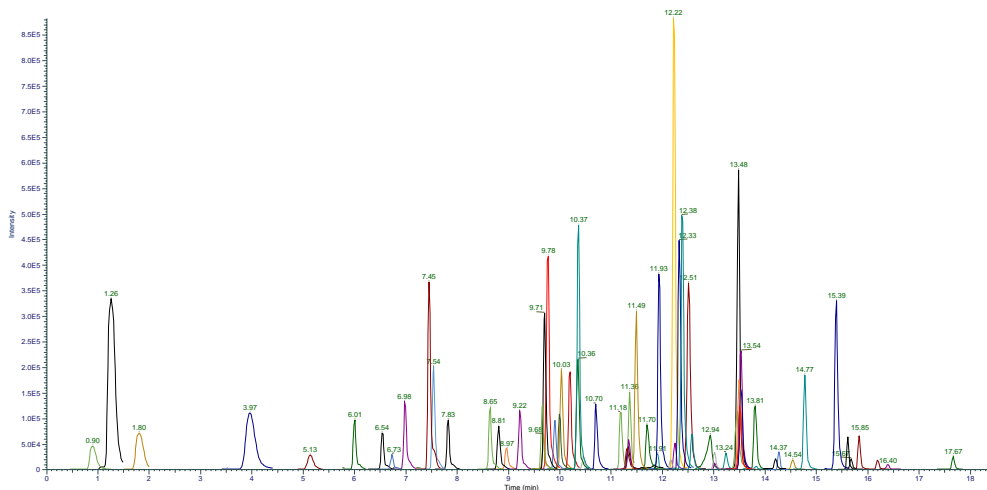


Figure III.10: Chromatogram of a spiked of olive oil extract obtained using clean-up with EMR-Lipid sorbent.

Table III.7: Analytical performance of the UHPLC-MS/MS method using EMR-Lipid in the three matrices, with the current EU MRL levels.

Matrix Pesticide		ANALYTICAL PARAMETERS								
		OLIVE OIL			OLIVES			AVOCADO		
		R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
Acephate	0.9997	6.4	100	0.9997	6.2	20	0.9980	9.4	10	
Acetamiprid	0.9992	1.0	50	0.9991	2.4	10	0.9965	1.0	10	
Alachlor	0.9998	74	100	0.9998	9.2	20	0.9986	16.8	10	
Amitraz	0.9964	90	250	0.9997	71	50	0.9965	47.6	50	
Atrazine	0.9998	15	250	0.9997	2.0	50	0.9982	1.30	50	
Avermectin B1a	0.9992	71	50	ND	ND	10	0.9996	96	10	
Azinphos-methyl	0.9997	22	250	0.9993	20	50	0.9986	4.5	50	
Azoxystrobin	0.9994	2.4	50	0.9999	0.2	10	0.9972	5.6	10	
Benalaxyl	0.9990	0.4	250	0.9997	0.3	50	0.9963	0.6	50	
Buprofezin	1.0000	3.4	25000	0.9994	0.9	5000	0.9976	1.0	50	
Carbaryl	1.0000	46	100	0.9997	2.7	20	0.9986	20.5	10	
Carbendazim	1.0000	1.7	500	1.0000	5.4	100	0.9984	1.2	100	
Carbofuran	0.9998	0.5	100	0.9992	1.4	20	0.9968	0.3	10	
Carfentrazone-ethyl	0.9998	5.7	50	1.0000	5.9	10	0.9983	9.0	10	
Chlorfenvinphos	0.9997	8.0	100	0.9987	4.2	20	0.9982	8.9	10	
Chlorotoluron	0.9998	1.2	100	1.0000	3.8	20	0.9972	1.0	10	
Chlorpyrifos	0.9994	6.8	250	ND	ND	50	1.0000	21	50	
Chlorpyrifos-methyl	0.9999	48	250	0.9978	29	50	0.9973	45	50	
Diazinon	0.9999	0.9	100	1.0000	15	20	0.9937	2.5	10	
Difenoconazole	0.9989	13	10000	0.9981	24	2000	0.9991	28	100	
Diflufenican	0.9994	29	1000	0.9967	61	200	1.0000	32	10	
Dimethoate	0.9996	2.3	10000	0.9993	8.0	2000	0.9973	0.8	20	
Dimethomorph	1.0000	0.1	100	0.9994	1.4	20	0.9973	2.5	10	
Diuron	1.0000	40	100	0.9993	17	20	0.9970	32	10	
Dodine	0.9994	47	100000	0.9968	41	20000	0.9998	43	50	
Ethion	0.9988	27	50	ND	ND	10	ND	ND	10	
Etofenprox	0.9994	14	50	ND	ND	10	ND	ND	10	
Fenamiphos	0.9993	3.8	250	0.9994	0.4	50	0.9963	0.5	20	
Fenamiphos-sulfone	0.9991	0.3	250	0.9999	4.7	50	0.9971	20	10	
Fenhexamid	0.9997	29	250	0.9993	8.2	50	0.9982	31	50	
Fenthion	0.9986	72	50	0.9996	67	10	0.9990	22	10	
Fenthion-sulfoxide	0.9993	13	50	0.9993	6.9	10	0.9970	7.4	10	

Matrix Pesticide		ANALYTICAL PARAMETERS								
		OLIVE OIL			OLIVES			AVOCADO		
		R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
Flufenoxuron	0.9997	1.3	250	ND	ND	50	1.0000	28	50	
Imidacloprid	0.9998	40	5000	0.9992	8.4	1000	0.9988	5.8	1000	
Isoproturon	0.9992	8.0	50	0.9999	18	10	0.9966	31	10	
Kresoxim-methyl	1.0000	12	250	0.9998	2.5	50	0.9964	16	50	
Malaoxon	0.9990	0.08	100	1.0000	4.0	-	0.9957	0.5	-	
Malathion	0.9995	13	100	0.9998	3.9	20	0.9995	6.4	20	
Metalaxyl	0.9993	0.9	250	0.9996	0.8	50	0.9959	0.1	50	
Methamidophos	0.9990	0.8	100	0.9999	92	20	0.9966	40	10	
Methidathion	0.9999	77	100	1.0000	46	20	0.9940	62	20	
Methomyl	0.9999	0.8	250	0.9999	1.2	50	0.9994	1.5	20	
Monocrotophos	0.9993	2.0	100	0.9999	5.0	20	0.9973	1.4	10	
Norflurazon	0.9997	12	50	0.9992	4.6	10	0.9946	0.6	10	
Omethoate	0.9999	0.6	10000	0.9995	1.3	-	0.9972	1.1	-	
Paclobutrazol	0.9999	2.3	2500	0.9995	13	500	0.9977	1.6	500	
Penconazole	0.9999	0.4	250	0.9994	3.3	50	0.9988	0.2	50	
Phosmet	0.9995	94	15000	0.9993	32	3000	ND	ND	50	
Pirimiphos-methyl	0.9992	2.2	250	1.0000	1.8	50	0.9986	4.3	50	
Propargite	0.9992	17.7	100	ND	ND	20	ND	ND	10	
Pyrimethanil	1.0000	2.8	100	0.9992	6.7	20	0.9983	4.6	10	
Pyriproxifen	1.0000	4.8	250	0.9992	4.6	50	1.0000	2.7	50	
Quinalphos	0.9998	1.1	100	0.9999	2.2	20	0.9969	1.1	10	
Quinmerac	0.9993	44	500	1.0000	11	100	0.9979	33	100	
Quizalofop-p-ethyl	0.9998	5.6	250	0.9992	29	50	1.0000	10.5	50	
Rotenone	0.9999	66	100	0.9976	90	20	0.9981	30	10	
Simazine	1.0000	28	50	0.9996	3.0	10	0.9979	92	10	
Spinosyn A	0.9998	14.5	100	0.9985	5.2	20	0.9987	19	20	
Spinosyn D	0.9994	75	100	0.9932	45	20	0.9997	12	10	
Tebuconazole	0.9999	38	250	0.9992	12	50	0.9983	16	20	
Terbutylazine	0.9999	12	250	0.9990	8.3	50	0.9967	1.7	50	
Terbutylazine-desethyl	0.9999	14	50	0.9998	6.2	10	0.9975	10	10	
Tetraconazole	0.9991	9.6	100	0.9975	1.5	20	0.9963	9.3	20	
Thiacloprid	0.9996	35	20000	0.9991	6.2	4000	0.9973	19	20	
Thiamethoxam	0.9997	40	2500	0.9988	11	500	0.9982	0.5	50	

Matrix Pesticide		ANALYTICAL PARAMETERS								
		OLIVE OIL			OLIVES			AVOCADO		
		R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	MRL ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
Thiophanate-methyl	0.9991	91	500	0.9989	17	100	0.9912	59	100	
Trichlorfon	0.9996	19	100	1.0000	11	20	0.9991	23	10	

ND: Not detected

### III.1.4.- Conclusions

In order to improve the clean-up step for multiresidue analysis of pesticides in edible oil and other fatty matrices by UHPLC-MS/MS, different sorbents following acetonitrile partitioning (QuEChERS) have been evaluated in three representative fatty vegetable matrices: olive oil, olives and avocado. For the extraction and clean-up of olive oil, the use of EMR-Lipid provided some advantages in terms of extraction efficiency and matrix effects compared to Z-Sep and PSA+C18, providing appropriate recoveries with minor matrix effects in most cases. Z-Sep displayed also better recoveries than PSA+C18. Precision achieved for the entire method using the three sorbents was appropriate with most analytes within 10 % RSD threshold. Meanwhile for olives, probably the more demanding matrix given the high concentration of both lipophilic and polar co-extracted species, the results were not as satisfactory as for olive oil. Better removal of coextracts was achieved with PSA+C18 clean-up although this fact did not provide any visible improvement in terms of matrix effects or recoveries compared to the other sorbents. Finally, in the case of avocado, the recoveries achieved with EMR-Lipid were slightly better again. As a main conclusion, we found a distinctly better performance of EMR-Lipid for olive oil clean-up, whereas only slight advantages in terms of matrix effects or recoveries have been demonstrated with regards to the other tested clean-up approaches. Perhaps, the more interesting feature of EMR-Lipid is the overall increased precision for all the tested experiments compared to the other sorbents, which makes it the more suitable option.



### III.2- DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POLARES EN ACEITUNA Y ACEITE DE OLIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE INTERACCIÓN HIDROFÍLICA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM Y DE ALTA RESOLUCIÓN

Publicado en Talanta, volumen 158, 222-228 el 24 Mayo de 2016.  
doi: [10.1016/j.talanta.2016.05.058](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.058)

#### RESUMEN

El número de productos fitosanitarios que se utilizan en la agricultura es cada vez mayor, a la vez que las sustancias activas presentes en los mismos. Cada vez son más las estructuras químicas polares utilizadas, con el objetivo de tener una fácil eliminación al entrar en contacto con el entorno. La presencia de grupos químicos polares conlleva que el análisis de estos compuestos mediante cromatografía de gases o cromatografía de líquidos de fase reversa no sea posible o no cumpla con los criterios de calidad (sensibilidad, precisión, etc.) establecidos. Esto hace que requiera una determinación mediante métodos cromatográficos más específicos, como el uso de formadores de pares iónicos, o de columnas de naturaleza polar (cromatografía líquida de fase normal). Entre esta última opción, la cromatografía de líquidos interacción hidrofílica (HILIC) presenta una elevada capacidad para retener compuestos polares de forma eficaz, constituyendo una alternativa que aporta ventajas frente a otras aproximaciones (pares iónicos, derivatizaciones) para el análisis de compuestos polares.

En este trabajo, se han desarrollado dos métodos para la determinación de plaguicidas polares en muestras de aceituna y aceite de oliva mediante la técnica HILIC combinada con dos tipos de detección: espectrometría de masas en tándem con un analizador de triple cuadrupolo (HILIC-MS/MS) operando en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), y espectrometría de masas de alta resolución, utilizando un analizador de tiempo de vuelo (HILIC-TOFMS). Los plaguicidas polares seleccionados para este estudio fueron: amitrol, cyromazine, diquat, fosetyl-aluminium, mepiquat, paraquat y trimethylsulfonium (contraíón de glyphosate).

El tratamiento de muestra propuesto es sencillo y rápido. Está basado en una extracción con metanol ligeramente acidificado (basada en el método QuPPE (*Quick method for polar pesticides*)). La eficacia de este procedimiento fue examinada en términos de porcentajes de recuperación y de efectos matriz, tanto en aceituna como en aceite de oliva. Los resultados obtenidos para aceite de oliva fueron satisfactorios. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas

para la extracción de diquat, paraquat y amitrol en aceituna fueron muy bajas, principalmente debido a la complejidad de dicha matriz, pese a las diferentes aproximaciones que se abordaron para mejorar este resultado. No obstante, la repetitividad del método era adecuada. Por lo que respecta a los efectos matriz, éstos fueron menores en el caso del aceite de oliva (20% de supresión media), mientras que en la aceituna aparecieron supresiones medias mayores (30-50%). El estudio fue validado para la determinación de los plaguicidas estudiados, obteniendo límites de cuantificación por debajo de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  para la mayoría de los casos cuando la espectrometría de masas en tándem fue utilizada. A su vez, dichos límites están en concordancia con los MRLs establecidos por la legislación vigente europea.

---

### III.2.- DETERMINATION OF POLAR PESTICIDES IN OLIVE OIL AND OLIVES BY HIDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY AND HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

#### ABSTRACT

This article reports the development of two HPLC-MS methods for the determination of polar pesticides in olive oil and olive samples by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) separation followed by mass spectrometry detection with tandem mass spectrometry using a triple quadrupole instrument operated in multiple reaction monitoring mode (HILIC-MS/MS) or electrospray time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOFMS). The selected polar pesticides included in the study were: amitrol, cyromazine, diquat, paraquat, mepiquat, trimethylsulfonium (trimesium, glyphosate counterion) and fosetyl aluminium. The simple sample treatment procedure was based on liquid partitioning with methanol. The performance of the sample extraction was evaluated in terms of recovery rates and matrix effects in both olive oil and olives matrices. The results obtained for olive oil were satisfactory while, due to the high complexity of olives, poor recovery rates were obtained for the extraction of diquat, paraquat and amitrol, although with a reasonable precision enabling its use in routine analysis. Similarly, matrix effects were minor in the case of olive oil (ca. 20% suppression average), while significantly higher suppression was observed for olives (30-50% suppression average). The studied approaches were found to be useful for the determination of the pesticides studied in olive oil and olives with limits of quantitation below  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  in most cases when tandem mass spectrometry was used, thus being in compliance with MRLs set by current EU regulation.

### III.2.1.- Introduction

Olive oil is the most consumed edible oil in the Mediterranean region, particularly in Spain, Italy and Greece, the largest olive oil producers. The significance of extra virgin olive oil is not only attributable to its unique sensorial and nutritional benefits but also due to its demonstrated health benefits, such as reduction of cardiovascular diseases, prevention of atherosclerosis or antioxidant properties (Ghanbari et al., 2012; Poole & Blades, 2013). The assessment of high quality and food safety standards is of paramount interest, particularly the control of chemical contaminants (Carvalho, 2006), with a special emphasis on pesticides and crop protection products, which are commonly used in modern agriculture, which can lead to food and environment problems (Hernández et al., 2013; Mostafalou & Abdollahi, 2013; Papadakis et al., 2015).

Pesticide residue analysis in fatty matrices is addressed by means of multiresidue methods covering a vast array of compounds with a generic sample treatment (Gilbert-López et al., 2009; García-Reyes et al., 2007b; Wilkowska & Biziuk, 2011). For this purpose, QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), (Annastasiades et al., 2003; Cunha et al., 2007b) is the default procedure for the extraction of contaminants in food with different versions based on clean-up approaches depending on the fat content in the sample (Annastasiades et al., 2003; Cunha et al., 2007b; Polgár et al., 2012; Lehotay et al., 2010; Gilbert-López et al., 2010a; Gilbert-López et al., 2010b). The most common approach for clean-up is dispersive solid phase extraction (dSPE), although solid phase extraction (SPE), gel permeation chromatography (GPC) and low-temperature fat precipitation have also been used (Gilbert-López et al., 2009; García-Reyes et al., 2007b; Wilkowska & Biziuk, 2011). These procedures are followed by separation and determination with gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS), (Amvrazi & Albanis, 2006; Aramendía et al., 2007) or liquid chromatography/ tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as detection technique (Annastasiades et al., 2003; Cunha et al., 2007b; Polgár et al., 2012; Lehotay et al., 2010; Gilbert-López et al., 2010a; Gilbert-López et al., 2010b; Amvrazi & Albanis, 2006; Aramendía et al., 2007).

While the standard protocol described is suitable for a broad variety of chemicals, there are selected compounds demanding dedicated methodologies due to their singular physicochemical properties (usually high polarity) known as *single-residue-method* compounds, which usually exhibit a poor chromatographic behaviour on usual reversed phase HPLC columns (European Reference Laboratories Portal; last accessed, 2016; EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, 2016) and/or significant decomposition/losses during QuEChERS extraction. For these compounds the European Reference laboratories have issued different protocols for their

---

analysis (European Reference Laboratories Portal; last accessed, 2016; EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, 2016), particularly the so called QuPPE (Quick Polar Pesticides Method) (EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, 2016), which makes use of different chromatographic separation mechanisms, including hydrophilic interaction chromatography (HILIC), (Alpert, 1990) to determine highly polar pesticides in foods of plant origin.

The presence of polar pesticides in virgin olive oil is unlikely given their different physicochemical properties and, thus the relative preference of polar pesticides towards the aqueous-phase during virgin olive oil production instead of the oil phase. In the case of olives, the matrix contains many polar species and a high percentage of water, so that the expected behaviour of polar pesticides may be different. Scarcely any literature is available on the analysis of polar pesticides in olive oil (Aramendía et al., 2006; Zougagh, Bouabdallah, Salghi, Hormatallah, & Rios, 2008), whilst, to the best of our knowledge, there are no previous reports on the determination of this type of contaminants in olives. However, as polar pesticides may exhibit solubility in fatty matrices such as olives given the relatively high water content, it would be interesting to study the behaviour of these polar compounds in olives and olive oil samples for instance to evaluate the extent in which they are transferred during olive oil production. With this in mind, the aim of this work was to develop a method for the determination of highly polar pesticides in olives and olive oil matrices, using HILIC separation and mass spectrometry detection.

### III.2.2.- Experimental

#### III.2.2.1.- Chemical and reagents

HPLC grade methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN), n-hexane, formic acid (HCOOH), ammonium formate and sodium chloride (NaCl) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Petroleum ether was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA) was used throughout the study to obtain HPLC water used during the analyses. Petroleum ether saturated with MeCN was prepared by adding 10 ml of MeCN to 50 ml of petroleum ether. Analyte-grade pesticide standards were acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), except diquat dibromide monohydrate, paraquat dichloride and fosetyl-aluminium, which were provided from Dr. Ehrenstorfer (LGC - Dr. Ehrenstorfer, Ausburg, Germany). Standard solutions of target compounds were prepared by dissolving an accurately weighted portion of the pesticides (approximately 25 mg powder or liquid) in 50 mL of an appropriate solvent, and they were stored at -18 °C. Diquat and paraquat

needed specific conditions such as storage in plastic bottles and the use of acidic media to dissolve them. A working solution containing all compounds was prepared at  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in MeCN. Oasis MCX (150 mg, 6 mL) SPE cartridges were acquired from Waters (Millford, MA), while C18 SPE Bond Elut cartridges (500 mg, 6 mL) were obtained from Agilent (Santa Clara, USA). A Visiprep™ SPE vacuum system (Supelco (Bellefonte, PA)) was used for SPE experiments.

### III.2.2.2.- Selection of analytes

Seven polar pesticides were selected. Details on the chemical class, polarity (as log Kow) and function are provided in table III.8. The selection was made considering their use in olive groves and also the Reglamento (CE) 396/2005 of the European parliament on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin.

**Table III.8: Chemical information of target pesticides**

Pesticide	Molecular formula	Log Kow	Chemical family	Use
Amitrol	$\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$	-0.97	Triazole	Herbicide
Cyromazine	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_6$	-0.07	Triazine	Insecticide
Diquat dibromide	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{N}_2$	-4.6	Quaternary ammonium salt	Herbicide
Fosetyl-Aluminum	$\text{C}_6\text{H}_{18}\text{AlO}_9\text{P}_3$	-2.1	Organophosphate	Fungicide
Mepiquat chloride	$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ClN}$	-3.55	Quaternary ammonium salt	Herbicide grown regulator
Paraquat dichloride	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$	-4.5	Quaternary ammonium salt	Herbicide
Trimesium	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{NO}_5\text{PS}$	-2.9	Organophosphate/ glycine derivative	Herbicide

### III.2.2.3.- Olive oil and olives samples

Olive oil samples were purchased from local supermarkets and olives samples were picked up from several plots of olive grove from the province of Jaén (Spain). Sampling of olives was done according to the Spanish sampling regulation for pesticide residues monitoring in foodstuffs (Real Decreto 290/2003). Briefly, one kilogram of representative whole olives was picked, at the same height of the view and around the four cardinal points. They were frozen at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  until sample treatment. Approximately 500 g of olives (including the kernel) were crushed by means of a mill manufactured by Talleres Lopera (Priego de Córdoba, Córdoba, Spain). The details are described elsewhere (López-Blanco et al., 2016a).

#### III.2.2.4.- Sample treatment

The sample treatment for olives and olive oil was adapted from the guidelines of QuPPE protocols (EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, 2016). The procedures used were as follows:

*Olive oil:* 10 g of olive oil were weighted into a 50 mL centrifuge tube, then 10 mL of MeOH with 1% of HCOOH and 10 mL of ultra-pure water were added. The general procedure consisted of shaking the mixture vigorously for 1 minute. A heating step was included to quantitatively extract diquat and paraquat (80 °C, 15 minutes). Afterwards the mixture was shaken again for 1 minute by hand and then the tube was centrifuged during 3 minutes at 3500 rpm. An aliquot of 1 mL of aqueous phase was diluted with 4 mL MeCN with 0.1 % of HCOOH and filtered through 0.45 µm pore diameter filter, achieving a final dilution factor of 1:10.

*Olives:* 10 g of olive paste were weighted into a 50 mL centrifuge tube, 5 mL of ultrapure water were added since it was assumed that the amount of water in the paste was 50% (Ghanbari et al., 2012) and finally 10 mL of MeOH with 1% of HCOOH were added on. The heating step was eliminated since it yielded dirty extracts that prevented to obtain clean aqueous phase. So, the next step was shaking vigorously for 1 minute and then centrifugation for 3 minutes at 3500 rpm. After that, 1 mL of the supernatant was diluted with 4 mL MeCN (0.1 % of HCOOH) and the resulting solution was centrifuged again 3 minutes at 3500 rpm. Finally, prior analysis by LC-MS-MS the extract was filtered through 0.45 µm pore diameter filter.

#### III.2.2.5.- HILIC-MS/MS analysis

##### i) HILIC-TOF/MS

An Agilent 1290 UHPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an Agilent Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus column (2.1 mm x 100 mm, 1.8 µm particle size) was used. Mobile phases A and B were 100 mM ammonium formate at pH 2.85 adjusted with HCOOH, and MeCN with 0.1% (v/v) HCOOH respectively. The chromatographic method started with a linear gradient from 90% B to 80% B for 10 min at 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, then it dropped from 80% B to 40% B in 3 minutes at 0.3 mL·min<sup>-1</sup> and finally it was kept at 40% B for 3 minutes (total run: 16 min). However, for fosetyl-aluminium was necessary to perform a dedicated negative ionization chromatographic method to enhance peak shape and sensitivity, thus same mobile phases with a different gradient which started at 90% B and reached 40% B at

10 minutes, after one minute was kept at 20% 4 minutes was selected at a flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>.

The UHPLC was connected to a time-of flight mass spectrometer (Agilent 6220 accurate mass TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an electrospray interface operated in positive or negative ionization mode (separately), using the following operation parameters: capillary voltage, 3500 V (2500 V for negative ion); nebulizer pressure, 40 psi; drying gas flow rate, 9 L·min<sup>-1</sup>; gas temperature, 325 °C; skimmer voltage, 65 V; octopole rf, 250 V; fragmentor voltage: 190 V. LC-MS accurate mass spectra were recorded across the m/z range 50–1100. Accurate mass measurements of each peak from the total ion chromatograms were obtained using an automated calibrant delivery system to provide mass correction. The instrument performed the internal mass calibration automatically, using a dual-nebulizer electrospray source with an automated calibrant delivery system, which introduces the flow from the outlet of the chromatograph together with a low flow (approximately 10 µL·min<sup>-1</sup>) of a calibrating solution containing the internal reference masses purine (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>4</sub>/[M+H]<sup>+</sup> at m/z 121.050873), HP-0921 ([hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropentoxo)-phosphazene] (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub>)/[M+H]<sup>+</sup> at m/z 922.009798 and [M-H+HCO<sub>2</sub>H]<sup>-</sup> at m/z 966.000725) and TFA ([CF<sub>3</sub>]<sup>-</sup> fragment at m/z 68.995858). The full-scan data recorded was processed with Agilent MassHunter Software (version B.04.00).

#### ii) HILIC-QqQ-MS

The optimized chromatographic method was also implemented with a triple quadrupole mass spectrometer operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode (Thermo TSQ Endura triple quadrupole analyzer, Thermo Scientific, San José, USA) coupled to a Dionex Ultimate 3000 rapid separation liquid chromatograph (Thermo Scientific, USA) UHPLC instrument equipped with the same HILIC column using the same method and mobile phases. No special conditions were required for sensitive detection of fosetyl-aluminium. A heated electrospray ionization probe (HESI) was used for the ionization of the analytes with the following experimental conditions: sheath gas 45, aux gas 13 arbitrary units; ion transfer tube temperature 320 °C; vaporizer temperature 250 °C; spray voltage: 3500 V (2500 V in negative). Both quadrupoles were operated at a resolution of 0.7 FMWH. Software Xcalibur version 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) was used for the creation of instrument methods and the running of samples. For the data analysis Tracefinder 3.2.5.12.0 software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) was utilized by creating a database in a csv file, which contained the optimized SRM parameters for all compounds.

---

## III.2.3.- Results and discussion

## III.2.3.1.- Optimization of chromatographic method

Column selection was made on the basis of the polarity of target analytes. Preliminary test with C18 column confirmed the low retention factor of all the studied analytes, which appeared in the peak void figure III.11. With regards to the optimization of the HILIC method, different buffer concentrations from 20 mM to 100 mM  $\text{NH}_4$ -formate were tested in the aqueous mobile phase at different pH values from 2.85 to 3.80. The lowest pH showed the optimal result in terms of peak shape and intensity for selected compounds. Moreover, to keep the pH constant throughout the run, the addition of 0.1% v/v  $\text{HCOOH}$  to MeCN led to better peak shapes in most cases. On the other hand, PQ and DQ exhibited the strongest retention among the compounds tested. Hence, to prompt their appropriate elution, it was necessary to increase the flow rate from 0.2 to 0.3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Examples of the chromatographic separation of the studied pesticides using HILIC-TOFMS and UHPLC-MS/MS are shown in figures III.12 and III.13.

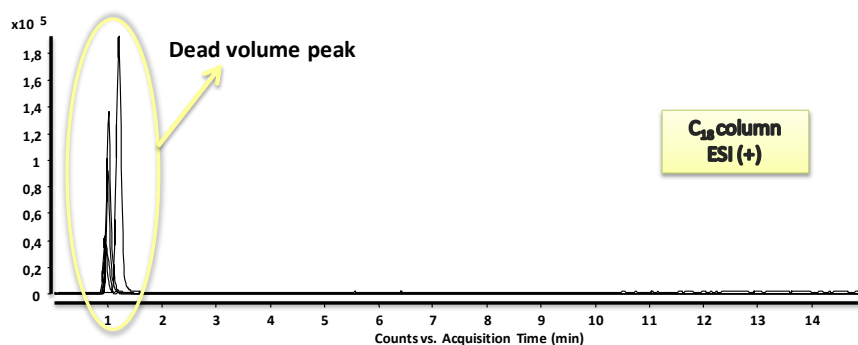


Figure III.11: Extracted ion chromatograms for selected pesticides by LC-TOFMS using a reverse phase column (C18)



Figure III.12: Chromatographic peaks of selected pesticides by UHPLC(HILIC)-TOFMS analysis of a matrix matched standard at  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ : a) olive oil; b) olives

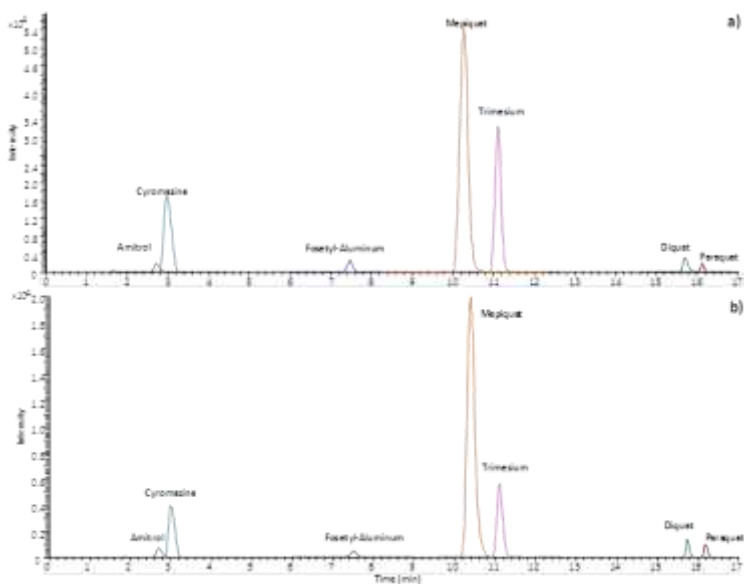


Figure III.13: Chromatographic peaks of qualifier transition of selected pesticides by UHPLC(HILIC)-QqQ-MS analysis of a matrix matched standard at  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for cyromazine, mepiquat, trimesium and diquat and  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for amitrol, fosetyl and paraquat: a) olive oil; b) olives

## III.2.3.2.- Optimization of sample treatment for olive oil and olives

Although olive oil samples are complex due to its high lipid content (nearly 100 %), this did not constitute a significant problem since the sample treatment is focused on polar compounds, so the extracts obtained with MeOH and ultrapure water did not contain too many co-extracted lipidic species, preventing instrument damage and losses of the target compounds.

In contrast, olives are probably one of the most demanding matrices in pesticide testing, given the combination of fatty components and hydrophobic species present which hamper any strategy to obtain clean extracts without sacrificing analyte recoveries. For this reason, several sample treatment approaches were conducted with the aim to remove interfering species and to achieve cleaner extracts. Figure III.14 shows the overlapped TICs of spiked olive oil and olives extracts with HILIC-TOFMS. The first experiment conducted was to assay the different diluting factors (10, 20 and 50). In order to minimize the dilution factors applied and the subsequent decrease of method performance in terms of LOQs, several clean-up procedures were investigated. In this sense, liquid-liquid partitioning with either n-hexane or petroleum ether saturated with MeCN, were tested to remove non-polar interferences. However, dirty extracts were obtained anyway, presumably due to the more polar character of the matrix interferences, so this strategy was discarded, as it really did not provide any practical advantage.

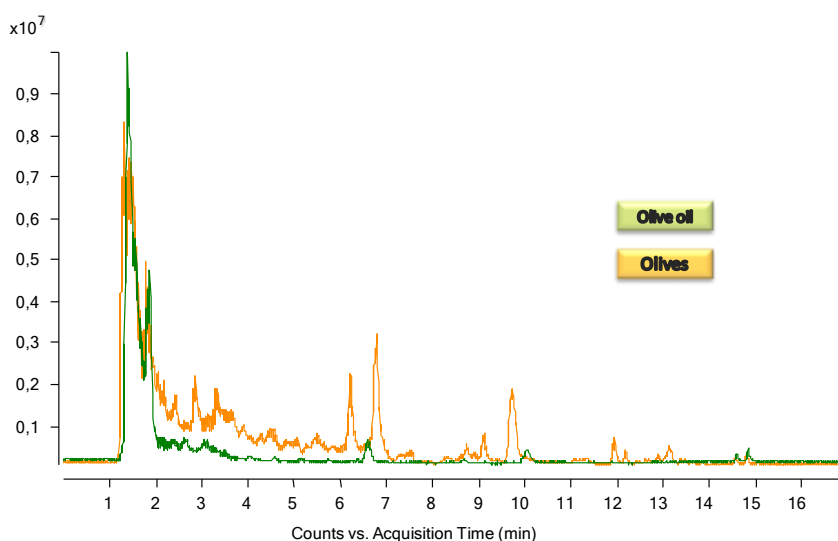


Figure III.14: Overlapped TIC chromatograms of spiked samples of olive oil and olives by HILIC-TOFMS analysis

As an alternative, the inclusion of a clean-up step with solid-phase extraction was evaluated using two different approaches: clean-up step for the removal of non-polar interferences using

C18 cartridges, or alternatively to selectively retain the target polar pesticides on an ion-exchange SPE cartridge (eg. Oasis MCX medium/mild cationic exchanger). In the first case with C18, different proportions of water were added to the water-methanolic phase from the first extraction of olives. The higher percentage of water allowed cleaner extracts. However, the high percentage of water was incompatible with the initial composition of the HILIC method leading to worse peak shapes and decreasing recovery values. When Oasis MCX was used, relatively clean extracts were obtained, nevertheless to improve ion exchange interactions, analytes should be ionized prior to the extraction, which required individual procedures for each analyte depending on their  $pK_a$ , so there was not possible to find conditions suitable for all the species as some of them may be strongly retained in the cartridge and lost (eg. quaternary ammonium species). With this mind, the initial 10-fold dilution of the extract without clean-up step was chosen since recovery values were higher although it offered dirtier extracts compared with the other tested approaches figure III.15.

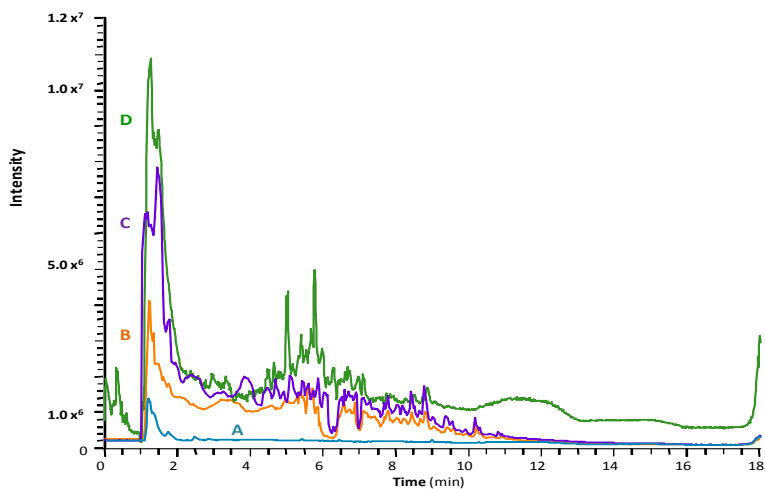


Figure III.15: Overlapped TIC chromatograms of olive extracts: A) Solvent, B) After clean-up procedure with C18 cartridges, C) After clean-up procedure with MCX cartridges and D) 1:10 dilution without clean-up.

#### III.2.3.3.- UHPLC (HILIC)-TOFMS method considerations

All the analytes were efficiently ionized in the positive ion mode except fosetyl-aluminum, which provided distinctly better results in the negative ion mode. Thus, to improve the performance of this analyte with UHPLC-TOFMS method, a dedicated gradient in negative ionization mode was proposed, as the positive ionization method used led to wider and less intense chromatographic peaks figure III.16.

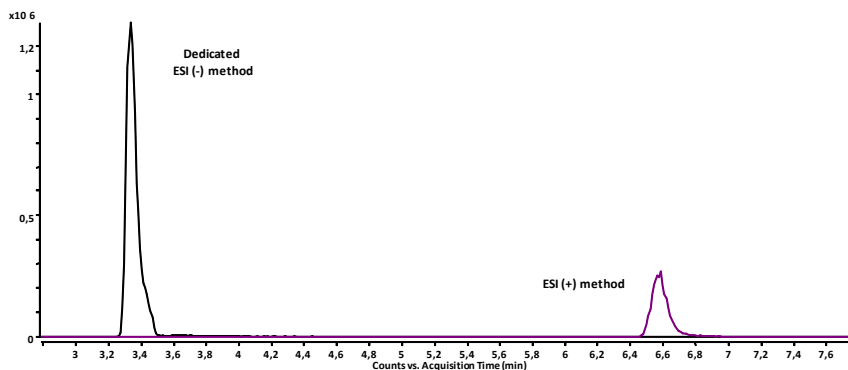


Figure III.16: Comparison of EICs peaks (HILIC-TOFMS) of fosetyl-aluminium by dedicated negative method and positive method chosen for the rest of compounds.

Analyte identification was conducted using accurate mass measurements of ions selected together with retention time. The protonated molecule was the more abundant ion for trimesium, amitrol and cyromazine, while the fragment corresponding with the loss of a methyl moiety for was the more abundant species in paraquat, the phosphate group from fosetyl-aluminium, the double charged ion for diquat and the single charged cation for mepiquat (table III.9). Due to the relative stability of these polar/ionized species and their relative low molecular weight, scarce in-source fragmentation was attained using UHPLC-TOFMS, so an additional confirmatory step would be required making use of an alternative technique such as UHPLC-MS/MS.

Table III.9: Identification parameters of polar pesticides by accurate mass measurements using UHPLC-TOFMS analysis

Pesticide	Molecular formula	$t_R$ (min)	Most intense ion	Theoretical m/z	Experimental m/z	Error (ppm)
Amitrol	$C_2H_4N_4$	2.62	$[M+H]^+$	85.0509	85.0516	-8,23
Cyromazine	$C_6H_{10}N_6$	2.98	$[M+H]^+$	167.1040	167.1038	1,01
Fosetyl	$[(C_2H_6PO_3)^-]_3$	3.34	$[C_2H_6PO_3]^-$	109.0060	109.0057	2,75
Mepiquat	$C_7H_{16}N^+$	9.31	$[M]^+$	114.1277	114.1281	-3,01
Trimesium	$C_3H_8S^+$	9.95	$[M+H]^+$	77.0419	77.0423	-4,88
Paraquat	$C_{12}H_{14}N_2^{+2}$	14.78	$[M-CH_3]^+$	171.0917	171.0918	-0,68
Diquat	$C_{12}H_{12}N_2^{+2}$	14.56	$[2M-2H]^{+2}$	183.0917	183.0918	-0,68

## III.2.3.4.- UHPLC (HILIC)-MS/MS method considerations

For the analysis of target pesticides by tandem mass spectrometry, an MRM mode acquisition method was built. Individual solutions of each analyte were injected by an external syringe pump connected by a Tee piece to the UHPLC to adjust the flow rate and composition to UHPLC conditions. The conditions described for HESI in experimental section were set as tuning conditions for the MRM of individual compounds. The tuning was performed with an infusion of 1 mg L<sup>-1</sup> (or higher depending on the sensitivity of the analyte) solution of each compound into the stream of the mobile phase (0,3 mL min<sup>-1</sup> of 100 mM ammonium formate/MeCN 50/50 all solvents acidified by 0.1% of HCOOH). The tube lens voltage and collision energy of the two most abundant transitions were automatically optimized by setting a top 10 experiment in which the 10 most intense fragments are chosen varying the collision energy from higher to smaller values automatically. The optimized parameters and MRM transitions are shown in table III.10. The method developed provides enough sensitivity for the detection of fosetyl-aluminium without a dedicated method, allowing negative and positive ionization analysis at the same run with at least two MRM MS/MS transitions for identification and quantitation.

Table III.10: Optimized MRM parameters for target compounds for their analysis by UHPLC(HILIC)-MS/MS

Pesticide	Polarity	RT (min)	Precursor m/z	Quant (Q) m/z	CE (V)	Confirm (q) m/z	CE (V)	Lens (V)
Amitrol	+	2.6	85.2	43.4	26	57.3	18	47
Cyromazine	+	3.0	167.1	85.3	20	68.3	35	79
Fosetyl	-	7.5	109.1	81.3	11	63.2	30	47
Mepiquat	+	10.5	114.2	98.2	26	58.4	25	69
Trimesium	+	11.1	77.2	62.3	28	47.4	15	30
Diquat	+	15.6	183.1	157.2	23	78.2	41	87
Paraquat	+	16.0	171.1	77.3	38	155.1	31	122

## III.2.3.5.- Analytical performance

Recovery experiments were performed by analyzing samples fortified (n=6) at two concentration levels, 5 mg·kg<sup>-1</sup> and 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> for olive oil and 50 mg·kg<sup>-1</sup> and 5 mg·kg<sup>-1</sup> for olives. This study, carried out using the UHPLC-TOFMS method, demonstrated appropriate recovery rates for olive oil (over 85 % for all pesticides at the highest concentration recovery level), while for olives, poor recovery rates were obtained, particularly for diquat, paraquat and

amitrol (table III.11). These results are consistent with the complexity of olives extracts, due to the high concentration of both hydrophilic and lipophilic species that represents a challenge when designing clean-up stages to remove co-extracted interfering species without analyte losses. The recovery rates are very low considering the simplicity of the extraction so there must be interactions of the species with significant losses (diquat, paraquat and amitrol) with the polar fraction of olive extract. On the other hand, and despite the major complexity of extracts and low recoveries, the precision of the overall extraction and determination methods were appropriate with RSD values well below 15 % for all compounds and matrices. Matrix effects were also evaluated and the results obtained, in terms of signal suppression compared to neat standards, were consistent with the higher complexity of olives, provided the higher suppression rates observed for this matrix (>33% for all compounds) compared with olive oil matrix (20% average).

Table III.11: Recovery values and RSD (%) for target pesticides obtained for the analysis in olive oil and olive matrices by UHPLC-MS/MS

Pesticide	Olive oil				Olives			
	0.5 mg·kg <sup>-1</sup>		5 mg·kg <sup>-1</sup>		5 mg·kg <sup>-1</sup>		50 mg·kg <sup>-1</sup>	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Amitrol	81.92	14.33	86.62	4.73	11.62	8.89	15.44	5.90
Cyromazine	98.54	8.65	102.49	1.82	54.17	2.80	60.65	6.49
Fosetyl	96.24	11.96	100.09	4.81	99.95	6.28	119.96	9.18
Mepiquat	74.66	3.05	98.33	1.00	68.57	5.36	88.66	2.94
Trimesium	84.37	4.23	101.06	2.48	57.25	14.65	72.70	10.01
Diquat	78.62	13.19	101.13	3.50	4.80	12.47	12.29	6.11
Paraquat	71.53	14.06	103.81	3.61	7.38	9.89	26.41	9.10

The linearity of the calibration curves, matrix effects and limits of quantitation (LOQ) were studied by UHPLC-TOFMS analysis using matrix-matched target compounds standard solutions at six concentrations levels ranging between 1 and 1000 µg·kg<sup>-1</sup> for olive oil and in the range 10-10000 µg·kg<sup>-1</sup> for olives samples. For this purpose, the extracts from olive oil and olive samples spiked before extraction were used, thus considering analyte losses during sample treatment. The response function in matrix-matched standards was found to be linear with a regression coefficient (R<sup>2</sup>) higher than 0.992 in the tested range for all the pesticides studied (table III.12). The LOQs were calculated using signal to noise ratio of the qualifier transition signals for UHPLC-MS/MS analysis, and the most abundant ion for UHPLC-TOFMS method. As was expected LOQs achieved by triple quadrupole analyzer were lower than those obtained by TOF instrument, except for the pair paraquat/olive oil. Thus, with the improvement in sensitivity and selectivity provided by UHPLC-MS/MS, the methodology for olives is suitable with LOQs within the MRLs indicated in current regulations (Reglamento (CE) 396/2005, and Reglamento (UE) 400/2014).

Table III.12: Analytical parameters by UHPLC(HILIC)-MS/MS and comparison of LOQs with UHPLC(HILIC)-TOFMS analysis method

Pesticide	Matrix effect (%)	Linearity (R <sup>2</sup> )	Peak Area <sup>a</sup> RSD (%)	RT RSD (%)	LOQ TOF (µg kg <sup>-1</sup> )	LOQ QQQ (µg kg <sup>-1</sup> )	MRL <sup>b</sup> (µg kg <sup>-1</sup> )
<b>Olive oil</b>							
Paraquat	+0.8	0.9927	6.58	0.06	3.3	12.0	100
Diquat	-14	0.9992	7.05	0.07	2.7	6.2	250
Mepiquat	-41	0.9988	4.05	0.16	0.5	0.1	250
Trimesium	-18	0.9925	1.50	0.13	3.0	0.1	5000
Amitrol	-24	0.9999	2.38	0.76	57.4	3.9	250
Cyromazine	-5	0.9987	2.92	0.36	7.8	0.8	250
Fosetyl	-52	0.9932	3.92	0.13	1.1	0.1	10000
<b>Olives</b>							
Paraquat	-33	0.9977	7.63	0.07	48.3	15.4	20
Diquat	-62	0.9933	6.07	0.07	100.1	42.8	50
Mepiquat	-43	0.9964	2.50	0.24	3.0	0.8	50
Trimesium	-71	0.9968	0.90	0.25	30.9	3.5	1000
Amitrol	-80	0.9978	2.67	0.81	660.9	40.5	50
Cyromazine	-55	0.9920	1.95	0.58	7.6	8.2	50
Fosetyl	-68	0.9935	3.52	0.65	40.2	1.8	2000

On the other hand, to evaluate the precision of the instrument, analysis of samples spiked with standard solutions of target compounds was performed under the optimized procedure (n=7). RSDs of area and retention time were calculated and results were lower than 10% for the area study and below 1% for retention time variation for both olive oil and olives samples as can be seen in table III.12. These results revealed the appropriate reproducibility achieved with the developed methodology according the SANTE guidelines (SANTE/11945/2015). As an example, figures III.12 and III.13 display chromatographic peaks of target analytes in olive oil and olives extracts using both instruments.

#### III.2.4.- Concluding remarks

In this work, two methods have been developed for the determination of polar pesticides in olive oil and olives samples by either UHPLC-TOFMS or UHPLC-MS/MS using HILIC separation. While the method for the determination of pesticides in olives and olive oil exhibits appropriate recoveries, minor or moderate matrix effects and high sensitivity regardless the instrument used, the complexity of olive matrix hampers the performance and analytical parameters. Higher LOQs and lower recovery values were obtained compared with values reached with olive oil methodology. However, the use of tandem mass spectrometry (UHPLC(HILIC)-MS/MS method) still allowed determination of target pesticides in compliance with MRLs set. Further progress should be conducted to minimize matrix effects and losses of these challenging analytes by means of additional tailored clean-up steps.

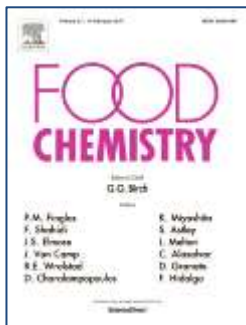
## **PARTE II: CÁLCULO DE FACTORES QUE EVALUEN LA TRANSFERENCIA DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS DURANTE EL PROCESADO DE ACEITUNA PARA LA PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA**

III.3.- EVALUACIÓN DE FACTORES DE PROCESADO PARA CONTAMINANTES ORGÁNICOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN: DISTRIBUCIÓN DE BTEXS DURANTE EL PROCESADO DE ACEITUNA

III.4.- DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL Y TEÓRICA DE LOS FACTORES DE PROCESADO DE PLAGUICIDAS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

---





### III.3.- EVALUACIÓN DE FACTORES DE PROCESADO PARA CONTAMINANTES ORGÁNICOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN: DISTRIBUCIÓN DE BTEXS DURANTE EL PROCESADO DE ACEITUNA

Publicado en Food Chemistry, volumen 199, 273-279 el 15 de Mayo del 2016. doi: [10.1016/j.foodchem.2015.11.132](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.132)

#### RESUMEN

Diariamente se generan multitud de residuos que se liberan al medioambiente como consecuencia de la actividad humana. Estos pueden contener sustancias químicas con potencial efecto tóxico para la salud humana, bien por inhalación, ingestión o contacto con la piel. De entre todos estos compuestos asociados a contaminación antropogénica, existe un grupo de compuestos denominados hidrocarburos aromáticos monocíclicos (MAHs), que son sustancias volátiles catalogadas como contaminantes y cuyas propiedades las hacen altamente peligrosas para la salud tras una exposición prolongada. Dentro de esta clase química, la familia de los BTEXS (benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos y estireno), se genera principalmente a partir de la combustión incompleta de combustibles fósiles y del uso de disolventes en la fabricación de pinturas y barnices. Son un grupo de compuestos orgánicos volátiles, líquidos a temperatura ambiente y solubles en tejidos orgánicos. Están considerados como agentes tóxicos y clasificados como sustancias carcinogénicas por lo que hay que extremar la precaución y evitar el riesgo a su exposición. La presencia de BTEXS en aceites de oliva vírgenes es un fenómeno que se atribuye a la contaminación ambiental, debido a la exposición de los cultivos a entornos altamente afectados por una concentración elevada de estas sustancias. Las fuentes potenciales de contaminación pueden ser carreteras con alta densidad de tráfico, polígonos industriales, proximidad a gasolinera, etc. Sólo en el caso del estireno se conoce que la presencia también puede deberse a procesos biológicos durante la lipogénesis en el fruto.

En este apartado, se ha procedido al estudio del comportamiento de estos hidrocarburos tanto en aceituna como en aceite de oliva, realizando un seguimiento desde su posible presencia en los cultivos mediante su análisis en el fruto, así como su transferencia hasta el aceite de oliva como consecuencia del proceso de elaboración del mismo. Para ello, en primer lugar, se realizó un estudio preliminar en cultivos cercanos a fuentes potenciales de contaminación (en este caso una carretera). Como norma general y aunque las concentraciones detectadas eran relativamente bajas, se encontraron valores de BTEXS mayores en las zonas cercanas a la

carretera. Estos niveles detectados no suponen riesgo alguno para la salud. En cuanto al estudio de su comportamiento durante la producción de aceite en la almazara, se calcularon experimentalmente los factores de procesado para poder conocer la eficacia de transferencia y el efecto de concentración en el producto final, mediante el uso de un sistema a escala de laboratorio (Abencor). El benceno mostró el valor de procesado más bajo (15%) en consonancia con su mayor solubilidad en agua, mientras que el tolueno y los tres isómeros del xileno presentaron porcentajes de transferencia medios (40-60%), y el etilbenceno y el estireno eran transferidos prácticamente en su totalidad al aceite de oliva (100%).

### III.3.- EVALUATION OF PROCESSING FACTORS FOR SELECTED ORGANIC CONTAMINANTS DURING VIRGIN OLIVE OIL PRODUCTION: DISTRIBUTION OF BTEXS DURING OLIVES PROCESSING

#### ABSTRACT

The presence of BTEXS (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and styrene) in virgin olive oils can be attributed to environmental contamination, but also to biological processes during oil lipogenesis (styrene). In this work, the processing factor of BTEXS from olives to olive oil during its production was evaluated at lab-scale with an Abencor system. Benzene showed the lowest processing factor (15%), whereas toluene and xylenes showed an intermediate behavior (with 40-60% efficiency), and ethylbenzene and styrene were completely transferred (100%). In addition, an attempt to examine the contribution of potential sources to olives contamination with BTEXS was carried out for the first time. Two types of olives samples were classified according to their proximity to the contamination source (road). Although higher levels of BTEXS were found in samples close to roads, the concentrations were relatively low and do not constitute a major contribution to BTEXS usually detected in olive oil

---

## III.3.1.- Introduction

Olive oil industry is a billion-dollar business in Spain that stands out as the main economic sector in selected areas such as the province of Jaén. Virgin olive oil is already an outstanding commodity due to its health promoting benefits. Considering the olive oil production figures and the increasing demand of consumers for high quality products, (Owen et al., 2000; Preedy & Watson, 2010) the assessment of high quality and food safety standards is of paramount interest, particularly regarding the absence of chemical contaminants.

Benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and styrene (BTEXS) are monocyclic aromatic hydrocarbons whose presence in the environment is usually attributed to incomplete fuel combustion (Alberici, Zampronio, Poppi, & Eberlin, 2002; Meniconi et al., 2002). Some of them have been used as industrial solvents and products for painting (Lopes & Bender, 1998; Wang, Li, Fingas, Sigouin, & Ménard, 2002). BTEXS are a subclass of volatile organic compounds, with boiling points between 80 and 150 °C, and they are considered hazardous carcinogenic and neurotoxic compounds, being issued as priority pollutants by Environment Canada (Fingas, et al., 1991) and the U.S. Environment Protection Agency (EPA), (List of list, 2012). These organic compounds are very volatile and, consequently widely distributed in the environment and, even in foods (Peña et al., 2004). Due to their high volatility and relatively high solubility in oils and fats, BTEXS can enter and contaminate olives, particularly if they are stored in enclosed spaces nearby vehicles or other fuel-based engines (Biedermann, Grob, & Morchio, 1995; Biedermann, Grob, & Morchio, 1996). The presence of BTEXS was first reported in virgin olive oil by (Olías-Jiménez, Gutiérrez-Rosales, Dobarganes-García, & Gutiérrez González-Quijano, 1980). In addition, styrene can be present in virgin olive oil samples by natural causes (Biedermann et al., 1995) or by transference from the plastic package (Carrillo-Carrión, Lucena, Cárdenas, & Valcárcel, 2007; Peña et al., 2004), proposed a cut-off threshold value of 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for the sum of BTEXS results in virgin olive oils, to consider it as positive finding.

Several studies have been carried out on the determination of BTEXS in virgin olive oils using different methodologies such as head-space solid-phase microextraction (HS-SPME), (Cavalli et al., 2003; Vichi et al., 2005), purge-and-trap with GC-MS (Olliver & Guérère, 2001), thermal desorption (Cavalli, Fernandez, Lizzani-Cuvelier, & Loiseau, 2004; Zunin et al., 2004), and headspace combined with mass spectrometry (Peña et al., 2004; Carrillo-Carrión et al., 2007; Gilbert-López et al., 2010c; Toledo, Enríquez, Garrido, Fernández-Band, & Richter, 2010). While factual information is available on the concentration levels of BTEXS in virgin olive oil, scarcely any literature is available for olives. Gilbert-López et al., (2010c), found up to 332  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of BTEXS in commercial extra virgin olive oils. Vichi et al., (2005), reported up to 372  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of

---

toluene in one sample. As regards to data on olives, Biedermann et al., (1996) proposed up to 250  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for the sum of benzene, toluene, and the C<sub>2</sub>-benzenes as possible background concentrations in olives.

The preliminary determination of BTEXS in olives can anticipate the possible contamination subsequently obtained in the final product. The study of the processing factor and behavior of BTEXS during virgin olive oil production is of paramount importance. In this sense, previous studies on the processing factors of selected pesticides during olive oil production stage are available (Cabras et al., 1997; Amvrazi & Albanis, 2008). Pesticide processing factors have been calculated in soybean-processed products (Zhao et al., 2014), apple juices and raisin products (Shabeer et al., 2015), amongst other derivate commodities. Consequently, polar pesticides presumably do not tend to preconcentrate in the olive-oil phase during its production, while fat-soluble pesticides tend to concentrate in the extent of the olive oil production yield from olives (García-Reyes et al., 2007b). Thus, the main aim of this work is to study processing factors of BTEXS from olives to virgin olive oil during the production stage at lab-scale. In addition, an attempt to examine the contribution of potential sources to olives contamination with BTEXS was carried out. Two types of olives samples were classified according to their proximity to a possible contamination source (such as gas stations or roads).

### III.3.2.- Experimental

#### III.3.2.1.- Chemicals and materials

Analytical-grade standards of benzene, toluene, ethylbenzene, the three isomers of xylenes (ortho, meta and para) and styrene, were purchased from Riedel de-Haën (OEKANAL® quality) (Seelze, Germany). Stock solutions of each analyte were prepared in methanol at a concentration of 1.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and stored in amber glass capped vials at -20 °C. A standard solution containing the mixture of BTEXS at individual concentrations of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was prepared in methanol by appropriate dilution of the stock solutions. Working standard solutions were prepared by spiking the standard solution to olives and olive oil samples (previously analyzed to check the initial content of BTEXS). HPLC-grade methanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). 20 mL glass flat-bottomed vials (22.7 mm OD x 75 mm) as well as magnetic PTFE-silicone seals (3.0 mm i.d.) were purchased from Supelco (Madrid, Spain). PTFE-encapsulated magnetic stirring bars (6 mm x 12 mm) were purchased from Varian Inc. (Walnut Creek, CA, USA). Potassium chloride (reagent grade) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA) was used throughout the study to obtain the HPLC-grade water used during the analyses.

The olives samples were picked up from several plots of olive grove from Andalucía region, while two different virgin olive oil samples were treated. One by extraction from olives by Abencor method and a second group were purchased at local market.

### III.3.2.2.- Head Space Gas chromatography/mass spectrometry

#### i) Gas chromatography/mass spectrometry

The separation of the species targeted was carried out using a CP-3800 gas chromatograph (Varian Inc. Walnut Creek, CA, USA) equipped with electronic flow control (EFC) and a 1079 universal capillary injector that allows programmed temperature injection (a PTV injection port). The gas chromatograph was also equipped with an autosampler (CombiPAL autosampler, CTC Analytics) with capacity for 32 headspace vials composed of an oven for sample heating/headspace generation and a robotic arm where the headspace syringe was place.

Helium was employed as carrier gas. The operating conditions of the headspace were: incubation time: 30 min; incubation temperature: 90 °C; magnetic stirring speed: 700 rpm. Then 1 mL of the vial headspace was injected into the GC inlet heated at 200 °C, operated in Splitless mode and equipped with a split open deactivated insert liner of 5 mm OD x 54 mm x 3.4 mm ID (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). The column oven temperature was set at 30 °C and remained constant during 10 min. After this time, the temperature was raised up to 60 °C at 5 °C/min, and after 1 min it raised up again to 200 °C at 20 °C/min. Then, it was kept at 200 °C for 2 min. A constant column flow of 1.5 mL/min of helium was used. A Varian FactorFour VF-5ms capillary column of 30.0 m x 0.25 mm i.d. and 0.25 µm of film size (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) was used for chromatographic separation.

The gas chromatograph was connected to a triple quadrupole mass spectrometer Varian 300-MS TQ MS (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) by an inert transfer line heated at 280 °C. The source and manifold (QQQ) temperatures were kept at 250 and 40 °C respectively. Electron impact ionization (EI) was operated at 70 eV. A filament current of 50 µA and a multiplier voltage of 1300 V were used in MS mode. Specific SIM ions were recorded for each compound analyzed (167 ms acquisition time for each ion). A filament multiplier delay of 2.3 min was fixed in order to prevent detector overload/saturation. The mass spectrometer was calibrated as needed with perfluorotributylamine (PFTBA). Varian WorkStation software (version 6.9) was used for automated analysis and data acquisition and Varian MS Data Review was used for data processing. Olives and olive oil samples were analyzed by an automated HS-GC-MS method described elsewhere (Gilbert-López et al., 2010c). The analytical parameters of the methods used are described in table III.13 and III.14.

---

Table III.13: Analytical figures of merit for the determination of BTEXS in olives using HS-GC-MS. For details see: Gilbert-López et al., 2010c.

Compound	LODs ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	LOQs ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	RSD (%) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	R <sup>2</sup>
Benzene	1.15	3.84	5.97	0.9987
Toluene	0.11	0.36	5.41	0.9989
Ethylbenzene	0.014	0.049	4.67	0.9983
m-, p-Xylene	0.08	0.29	4.83	0.9991
o-Xylene	0.16	0.50	4.96	0.9992
Styrene	0.37	1.25	4.59	0.9969

Table III.14: Analytical figures of merit for the determination of BTEXS in olive oil using HS-GC-MS. For details see: Gilbert-López et al., 2010c.

Compound	LODs ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	LOQs ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	RSD (%) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	R <sup>2</sup>
Benzene	0.5	2.20	18.11	0.9991
Toluene	0.4	1.25	14.49	0.9993
Ethylbenzene	3.7	14.40	11.30	0.9987
m-, p-Xylene	4.4	15.00	10.74	0.9992
o-Xylene	2.6	10.00	11.25	0.9983
Styrene	3.5	13.30	9.58	0.9980

#### ii) Head-space conditions

Olives samples. 5 g of olive paste (from 500 g of olives crushed in a mill) were weighed into a 20-mL HS glass vial with a PTFE-encapsulated magnetic stirring bar. Then 10 mL of milli-Q water plus, and 1.5 g of KCl were added and the vial was immediately sealed with a PTFE-silicone septum. Samples were analyzed by triplicate.

Extra virgin olive oil samples obtained from Abencor system. 12.5 g of olive oil (ca. 15 mL) were weighed into a 20-mL HS glass vial with a PTFE-encapsulated magnetic stirring bar and was immediately sealed with a PTFE-silicone septum. Samples were analyzed by triplicate. The HS vial was placed in the CombiPal heated module for heating with mechanical stirring (700 rpm) for 30 minutes at 90 °C in order to ensure the equilibration between gas-phase and sample. An aliquot of the (gas-phase) vial headspace (1 mL) was automatically injected in the GC-MS system. During GC-MS analysis specific SIM ions were recorded for each target compound.

### III.3.2.3.- Lab-scale experiment for BTEXS absorption in olive oil under saturated fuel atmosphere

Experiments were carried out introducing inside a desiccator a 1000 mL beaker containing 600 mL of virgin olive oil together with a 100 mL beaker where 50 mL of gasoline or gasoil were placed. It is supposed that the saturation of the volume of air inside the desiccator (10 L approx.) by volatile compounds coming from fuel is reached in a short period of time. Then, 9 aliquots of olive oil of 30 mL each one were taken during a period of 72 hours, 15 mL were put in a 20 mL head space vial for its prompt analysis by HS-GC-MS and the other 15 mL were kept for its further use if necessary. BTEXS concentration in gasoil and gasoline were estimated using standard addition method by spiking 15 mL of olive oil with fuel to a final proportion of fuel of 0.01% (v/v). The peak area obtained for each compound was interpolated in a matrix-matched standard calibration curve prepared at 50, 100, 200, 500 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The HS-GC-MS analysis of these samples was accomplished using the same experimental conditions previously described in section III.3.2.2.

### III.3.2.4.- Study of processing factors: Transfer from (spiked) olives to olive oil produced by a lab-scale Abencor system

To study the processing factors, the first step is spiking the milled samples, since there is no significant amount of BTEXS in them. Owing to this fact, 3.3 kg of homogenized olives mass were spiked adding a suitable volume of BTEXS mixture up to a final concentration of 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Later, the resulting mixture was gently stirred at room temperature for 60 minutes to foster analyte homogenization and allow solvent evaporation. Finally, it was kept at +4 °C overnight.

The second step was extracting the olive oil from the spiked olives, by means of an Abencor system (MC2 Ingeniería y sistemas, S.L., Seville, Spain), simulating commercial oil-extraction systems. Five portions (250 g each one) of the spiked mass (3.3 kg) were selected and introduced in the malaxater with a thermometer (model TB-100), where it was shaking for 30 minutes at temperatures lower than 20.6 °C. Malaxation temperature was kept at low values to avoid possible losses of BTEXS by evaporation. Afterwards, the paste was centrifuged for 1 min at 3500 rpm in the Abencor centrifuge (model CF-100) for phase separation (olive oil is separated from solids and water). Virgin olive oils obtained ( $n = 5$ ) were weighted and stored in opaque glass bottles until they were analyzed by HS-GC-MS. The BTEXS concentration levels of the spiked olives and their respective virgin olive oils were used to calculate a processing factor for each analyte.

---

## III.3.2.5.- Determination of BTEXS levels in olives samples

Sampling was done according to the Spanish sampling regulation for pesticide residues monitoring in foodstuffs (Real Decreto 290/2003). Briefly, one kilogram of representative whole olives was picked, at the same height of the view and around the four cardinal points. They were frozen at -20 °C, to preserve their composition until the moment in which the analysis was carried out. The day of the analysis, approximately 500 g of olives (including the kernel) were first crushed by means of a mill manufactured by Talleres Lopera (Priego de Córdoba, Córdoba, Spain) and designed especially for crushing up olives (molino triturador-reductor (M-R), 45 cm (length) x 51.5 cm (high) x 35 mm (width), 40 kg (weight)). The mill consisted in a hopper that led the olives to a worm gear connected to a rotor (1.1 kW). This rotor rips the olives and olive kernel, then obligating them to pass through a sieve of small orifices (5.0 mm i.d.). As a result, a homogenized paste is obtained and collected in an appropriate food-container.

## i) Distribution study of BTEXS in olive groves from Andalusia

Four provinces of Andalucía region were selected to do the sampling, Jaén, Málaga, Granada, and Córdoba, together with Badajoz, which is located in Extremadura community. A total number 40 of olives samples was picked during the season 2011-2012. The places selected can be seen in figure III.17. The samples have been differentiated depending on their proximity to the possible contamination sources; therefore we can analyze two different groups: the samples next to roads or fuel stations and those located inside of the olive groves (> 500 m far from a possible contamination source). Detailed information about the samples is included in table III.15.

Table III.15: Detailed information about BTEXS concentrations found in different samples of Andalusia ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

	Sample	B	T	E	m- + p-X	o- X	S	$\Sigma\text{BTEXS}$
Far	Azuaga Badajoz	-	-	1.1	1.7	4.9	-	7.7
	Alhaurín de la Torre Málaga	-	-	1.2	6.1	7.0	2.0	16.6
	Churriana Málaga	-	-	1.0	-	-	4.2	5.2
	Torrequebradilla	-	-	0.6	2.6	-	3.1	6.2

	Sample	B	T	E	m- + p-X	o- X	S	ΣBTEXS
Close to a contamination source	[Infanta-Bailén] (road)	-	-	0.5	2.8	5.1	7.3	15.7
	[Jaén-Mancha Real] (highway)	-	-	-	-	-	-	-
	Alhaurín de la Torre (A-404)	-	-	0.4	4.9	5.7	-	11.0
	Alhaurín de la Torre (C/Giacomo Puccini)	-	-	0.8	3.3	6.1	-	10.2
	Azuaga	-	-	0.7	3.4	5.1	-	9.3
	Baena	-	-	1.4	19.9	16.1	5.9	43.3
		-	-	1.2	25.7	13.5	4.4	44.8
	Bailén (road)	-	-	0.5	2.0	-	-	2.6
	Churriana (road de Álora)	-	-	0.7	5.4	6.4	8.9	21.4
	Corcoya	-	-	0.9	5.7	7.0	-	13.6
	Ibros	-	-	0.4	4.5	6.8	2.9	14.6
	Jaén (Bulevar)	-	-	0.8	10.4	9.7	6.3	27.2
	Jaén (road A-6050)	-	-	1.3	2.5	5.2	-	9.0
	Jaén (EDAR)	-	-	0.7	4.2	5.5	-	10.3
	Jaén (Gas station)	-	-	0.3	2.7	5.9	-	8.9
	Jaén (Gran Eje)	-	-	0.6	3.0	6.1	-	9.6
	Jaén (La Magdalena)	-	-	0.8	5.0	7.7	2.7	16.2
	Jaén (parque Bulevar)	-	-	1.0	12.4	12.5	5.7	31.6
	Jaén (Parque Industrial)	-	-	0.6	6.9	6.9	-	14.4
	Jaén (Políg. Los Olivares 1)	-	9.9	1.2	13.3	11.0	4.3	39.8
	Jaén (Políg. Los Olivares 2)	-	-	0.9	8.9	8.7	-	18.5
	Jaén (Ronda los olivares)	-	-	1.0	6.3	7.4	2.8	17.5
	Jamilena	-	-	0.8	6.2	6.7	-	13.7
	Las Infantas	-	-	-	4.4	7.7	9.4	21.4
	Linares (Road de Baños)	-	-	0.8	-	-	2.2	3.0
	Los Villares	-	-	0.4	4.2	6.3	2.3	13.2
	Mancha Real	-	-	0.4	3.2	4.9	2.2	10.7
	Mancha Real (entrada)	-	-	0.4	5.0	6.9	11.0	23.3
	Mengibar (IFAPA)	-	-	0.5	4.0	4.9	2.2	11.6
	Montillana	-	-	1.2	6.1	7.0	2.0	16.3
	Puente de Génave	-	-	1.2	6.3	7.2	4.3	19.0
	Torredelcampo	-	-	0.5	1.7	-	-	2.2
Torredonjimeno	-	-	-	2.1	-	-	2.1	
Torremolinos (Pinos)	-	-	-	-	-	-	-	
Torrequebradilla (highway)	-	-	0.4	3.3	6.1	5.8	15.6	
Villargordo	-	-	0.4	4.2	5.6	3.8	14.0	

B: Benzene; T: Toluene; E: Ethylbenzene; m-, p, o-X: m-, p-, o-Xylene; S: Styrene

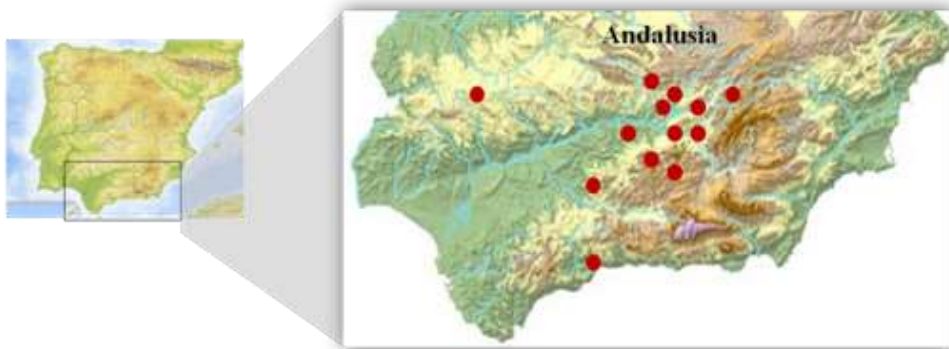


Figure III.17: Location of olives samples harvested throughout Andalusia region

- ii) Distribution of BTEXS in olive samples from an olive grove plot close to a contamination source (road).

First, thirty samples were selected from a plot of olive grove located near to Jódar (Jaén). The geographical coordinates are latitude  $37^{\circ} 52' 1.31''$  N and longitude  $3^{\circ} 21' 12.41''$  W, with an area of 1813 ha of surface and 186 olives trees. A satellite view of the plot can be seen in figure III.18.



Figure III.18: Aerial view of the olive grove, in which the olive trees closer to the secondary road (A-401) selected for the sampling are marked with red color, while the black circles refers to the trees selected to collect the olives inside the plot

Samples were collected during the season 2012-2013 and divided in two groups for the statistical study. The first group (identified with red circles) corresponds to samples collected near the road A-401, on the top of figure III.18. The second group (identified with black circles) corresponds to samples collected from inside of the plot (around 50-70 m far from the road). Their respective features and nomenclature are detailed in table III.16 and figure III.19.

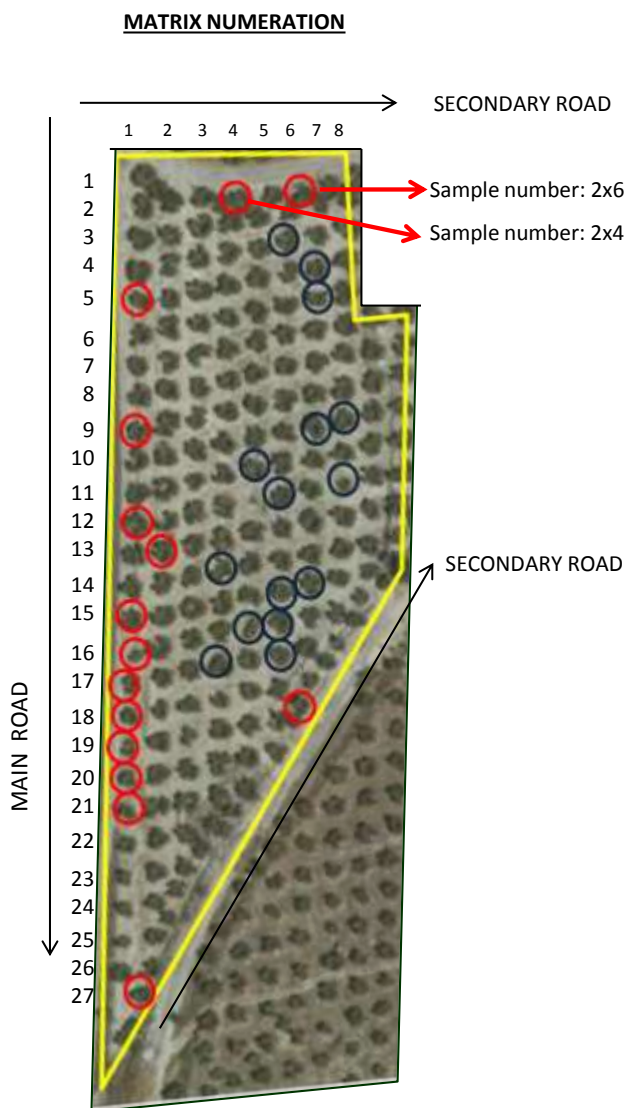


Figure III.19: Plot of studied olive grove and nomenclature used for sample ID

Table III.16: Features of each sample analyzed within the olive grove

	Number	Mass Sample (g)	Observations
Samples near the road A-401	2x4	973.6	Secondary road
	2x6	1051.6	Secondary road
	5x1	944.0	-
	9x1	1040.4	Secondary road
	12x1	955.4	-
	13x2	1076.0	Second line
	15x1	946.5	-
	16x1	1171.2	-
	17x1	1113.7	-
	18x1	1095.3	-
	19x1	853.2	-
	19x7	1092.3	Secondary road
	20x1	1153.8	-
	21x1	1080.4	-
27x1	1125.1	-	
Samples inside the grove	4x6	1126.1	-
	5x7	1077.7	-
	6x7	1015.0	-
	10x7	964.0	-
	10x8	1076.6	-
	11x5	875.3	-
	12x6	935.0	-
	12x8	919.5	-
	14x4	749.2	-
	15x6	1052.4	-
	15x7	1220.0	-
	16x5	1165.5	-
	16x6	886.0	-
	17x4	1008.9	-
17x6	904.6	-	

## III.3.3.- Results and discussion

## III.3.3.1.- BTEXS absorption experiment in a enclosed fuel-saturated environment

Due to their relatively high lipophilicity BTEXS absorption in olive oil may occur directly by fuel vapor exposure, as suggested by Biedermann et al., (1996). We performed a lab-scale experiment to study the absorption kinetics of BTEXS in olive oil by direct exposition to fuel vapors. As was previously indicated in the experimental section, 600 mL of olive oil were exposed to a saturated atmosphere of gasoline and gasoil separately. Results of these experiences by means of absorption curves ( $\mu\text{g}$  compound vs sampling time) of each BTEXS in gasoline atmosphere are shown in figure III.20.

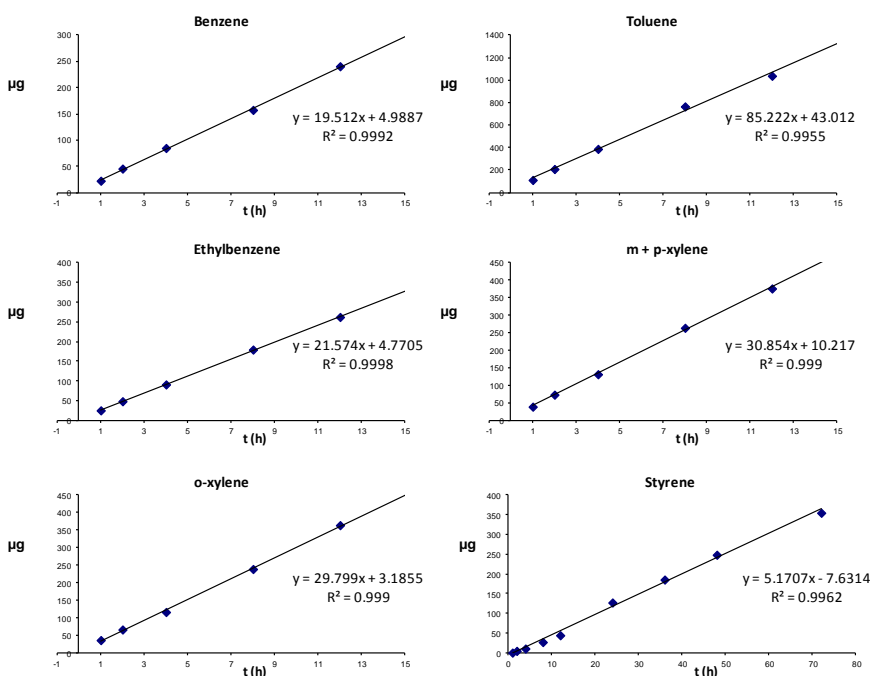


Figure III.20: Absorption curves of BTEXS in olive oil under gasoline saturated atmosphere. (t: exposition time (hours))

As can be seen, the absorption of these compounds in olive oil under the experimental conditions follows a linear trend. Saturation of detector is reached before the end of the experiment (only the linear region of calibration curve is shown in the graphics) for all compounds except for styrene, which is by far the least concentrated BTEXS in gasoline. Benzene is also present at low concentrations in gasoline although it displays the highest vapor pressure within the group (table III.17). In the case of gasoil atmosphere experiment, it was not possible

to construct the absorption curves since the instrument gave saturated signals for most of compounds with as little as one hour of exposure. These results are consistent with the higher concentration of BTEXS found in gasoil (table III.18). These results confirm the hypothesis of high affinity of these compounds for lipid matrices and highlight the importance of prevent the exposition of olives and olive oil to BTEXS sources such as for instance fuel-based engines or fuel tanks that should be kept away.

Table III.17: Main physicochemical properties of BTEXS

Compound	Molecular formula	Vapor pressure (mmHg; 25°C)	Water solubility (mg/L; 25°C)	Log Kow
Benzene	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	94.80	1790	2.13
Toluene	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	28.40	526	2.73
Ethylbenzene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	9.60	169	3.15
m-Xylene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	8.29	161	3.20
p-Xylene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	8.84	162	3.15
o-Xylene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	6.61	178	3.12
Styrene	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	6.40	300	2.95

Table III.18: Concentration of BTEXS in gasoil and gasoline

Compound	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	m-, p-Xylene	o-Xylene	Styrene
C gasoil (mg·L <sup>-1</sup> )	4576	56998	956	18298	13531	1841
C gasoline (mg·L <sup>-1</sup> )	172	2387	575	1004	1068	66

### III.3.3.2.- Lab-scale study of Processing factors of BTEXS during olive oil production

The olive oils obtained after Abencor extraction, were weighted and the yields were calculated. The results are shown in table III.19. Processing factors can be used to predict the concentration of BTEXS in the extra virgin olive oil from the concentration of BTEXS analyzed in the olives used as starting raw material. Additionally, processing factors are a useful tool to establish Maximum Residue Levels (MRLs) in processed foods. In fact, current EU regulations on pesticide residues in food consider MRLs from the raw material due to the lack of information about processing factors. The calculation of the processing factor for each analyte was based on a mass balance using the BTEXS concentrations found in the olives milled together with those found in the olive oils extracted from them, and the yield of each extraction.

Table III.19: Olives mass spiked (50 µg·kg<sup>-1</sup>), oil mass extracted and efficiencies obtained.

Samples	Olives mass milled (g)	Oil mass (g)	Yield (%)
Sample 1	250.4	26.0	10.38
Sample 2	249.8	20.2	8.09
Sample 3	250.5	31.8	12.69
Sample 4	250.0	27.7	11.08
Sample 5	250.0	27.4	10.96
Average	250.14	26.62	10.64
SD	0.30	4.19	1.66
RSD(%)	0.12	15.74	15.63

Thus, processing factor (PF) was calculated according to the equation I:

$$[I] \quad \frac{[BTEXS]_{olive\ oil}}{[BTEXS]_{olives}} * oil\ yield\ (\%)$$

The respective BTEXS concentration levels are displayed in table III.20, as well as the corresponding processing factor (PF) for each analyte, expressed in percentage of transference from olives to olive oil. For ethylbenzene and styrene, a value over 100% is obtained; therefore, they are completely transferred from the olives to the olive oil. However, toluene and xylenes are partially transferred, with processing factors ranging 20-50%. Finally, the lowest transference factor is for benzene, obtaining a value close to 15%. This is consistent with the higher water solubility of this compound compared to the other species (table III.17). Considering an average yield of 10.6% and a minimum transference of 14.6%, the analytes are more concentrated in the olive oil than in the olives. However, it should be noted that in the present study processing factors have been examined at relatively low temperature (20 °C) to prevent BTEXS losses by evaporation, whereas in the industrial production of extra virgin olive oil the olive paste is usually heated up to 25-35 °C during the malaxation step. The higher temperature used in the industrial process can favor BTEXS evaporation and therefore a lower transfer efficiency to the final product. On the other hand, the higher malaxation temperature and the occasional use of technological additives as talcum increase the yield (industrial yield for olive oil production is in the range 15-20%), modifying thus the concentration factor of BTEXS in the factory-scale produced virgin olive oil.

Table III.20: BTEXS concentration in olives and their corresponding virgin olive oil samples. Study of processing factor

	Olives		Oil		PF (%)
	Average [BTEXS] $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	RSD (%)	Average [BTEXS] $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	RSD (%)	
Benzene	68.82	7.32	96.05	16.69	<b>14.64 ± 1.60</b>
Toluene	59.05	9.07	247.62	13.68	<b>44.20 ± 5.05</b>
Ethylbenzene	104.19	11.69	1081.10	10.50	<b>110.35 ± 16.28</b>
m-, p-Xylene	53.55	5.70	256.57	10.09	<b>50.61 ± 5.97</b>
o-Xylene	45.10	5.30	88.50	11.17	<b>20.70 ± 2.43</b>
Styrene	143.95	10.29	1561.66	9.03	<b>115.39 ± 17.05</b>

### III.3.3.3.- Determination of BTEXS in olives collected different olive groves in Andalusia and within and olive grove close to a road

Concentrations of BTEXS found in the samples are summarized in figures III.21-22, where average concentration of BTEXS is represented, together with the interval between the minimum and the maximum values found in each group of studied samples. It is observed that samples close to a possible contamination source showed higher concentration of BTEXS, but in any case they were within the range considered as background concentrations (up to 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of benzene and 250  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for the sum of benzene, toluene, and the C<sub>2</sub>-benzenes), (Biedermann et al., 1996).

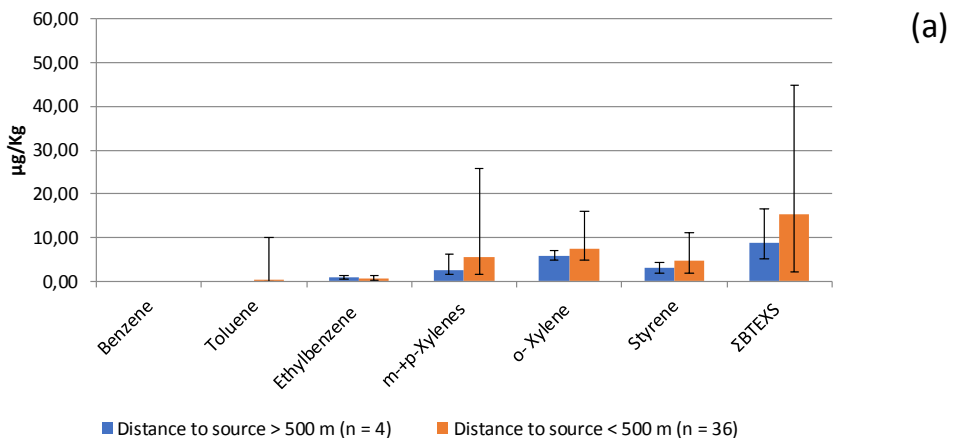


Figure III.21: a) Concentration ranges of BTEXS in the two groups of studied samples, far (>500 m) and close (<500 m) to a possible contamination source from different parts of Andalusia.

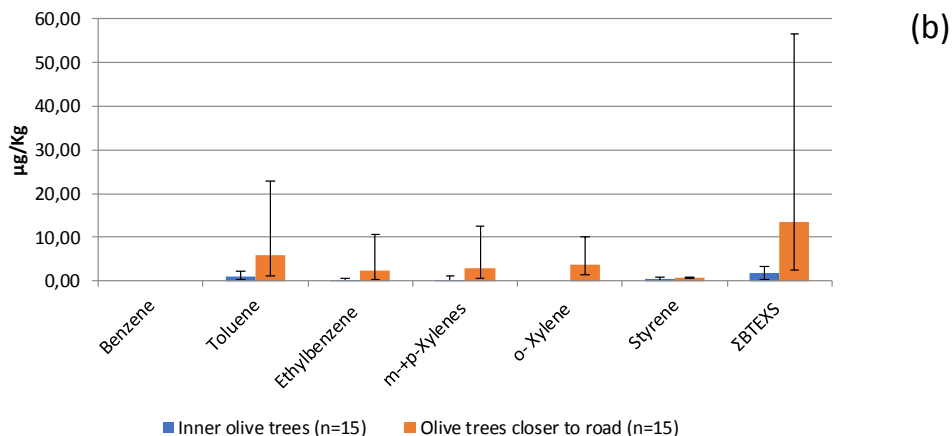


Figure III.22: b) Concentration ranges of BTEXS in olives samples from inner part of a plot and samples close to a road. The number of samples analyzed in each group is indicated in the parenthesis.

Some differences can be seen between the comparative study among different olive groves from Andalusia (figure III.21) and the comparative study of samples within the same olive grove plot (figure III.22). In the first study, toluene was only found in samples close to a potential source of contamination, while it was found in samples of the inner part of the olive grove plot of the second study. These results are consistent because in both cases the olive samples were harvested at a distance less than 500 m far from the contaminating source. On the contrary, o-xylene was found in the first study in samples far (> 500 m) from a potential source of contamination, while in the second study it was only found in samples collected in the samples closer to the road in the olive grove plot. Benzene was not detected in any of the studied samples, perhaps due to its high vapor pressure and the relatively high water solubility, so that it may eventually be removed from the olives surface by the rainfall. Detailed information about BTEXS concentrations found in different samples of Andalusia is given in section III.3.2.5 (table III.15).

*Distribution of BTEXS within an olive grove plot.* Concentrations of BTEXS found in different samples from the same olive grove plot are shown in table III.21.

Table III.21: BTEXS concentrations obtained from the analyses of olives from trees closer the road (contamination source) and from the inner of the olive plot

		BTEXS concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )					
	Sample code	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	m-, p-Xylene	o-Xylene	Styrene
Olive samples from trees closer to road (A-401)	2x4	N.D.	21.3	8.1	9.4	7.2	0.8
	2x6	N.D.	22.9	10.6	12.5	10.0	0.6
	5x1	N.D.	2.8	0.8	1.1	N.D.	N.D.
	9x1	N.D.	3.7	1.2	1.7	N.D.	N.D.
	12x1	N.D.	5.3	2.2	2.7	2.0	0.5
	13x2	N.D.	5.4	1.7	2.2	1.8	0.6
	15x1	N.D.	3.8	1.3	1.9	1.7	0.5
	16x1	N.D.	6.1	2.8	3.4	2.6	N.D.
	17x1	N.D.	2.9	1.0	1.4	N.D.	N.D.
	18x1	N.D.	4.4	1.8	2.5	1.9	N.D.
	19x1	N.D.	3.3	1.2	1.5	1.4	0.5
	19x7	N.D.	1.2	0.4	0.7	N.D.	0.5
	20x1	N.D.	2.5	0.9	1.2	N.D.	N.D.
	21x1	N.D.	2.8	1.2	1.5	N.D.	N.D.
	27x1	N.D.	1.2	0.5	0.8	N.D.	N.D.
	<b>Average (x<sub>1</sub>)</b>	N.D.	<b>6.0 (*)</b>	<b>2.4 (*)</b>	<b>3.0 (*)</b>	<b>1.9 (*)</b>	<b>0.3</b>

		BTEXS concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )					
	Sample code	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	m-, p-Xylene	o-Xylene	Styrene
Inner olives samples	4x6	N.D.	0.9	0.4	N.D.	N.D.	N.D.
	5x7	N.D.	1.5	0.2	1.0	N.D.	N.D.
	6x7	N.D.	0.5	N.D.	N.D.	N.D.	0.5
	10x7	N.D.	2.1	N.D.	N.D.	N.D.	0.8
	10x8	N.D.	0.9	N.D.	N.D.	N.D.	0.5
	11x5	N.D.	2.1	0.5	N.D.	N.D.	0.7
	12x6	N.D.	1.2	0.6	N.D.	N.D.	0.7
	12x8	N.D.	1.0	0.3	N.D.	N.D.	0.5
	14x4	N.D.	0.7	N.D.	N.D.	N.D.	0.5
	15x6	N.D.	0.6	N.D.	N.D.	N.D.	0.5
	15x7	N.D.	0.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	16x5	N.D.	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	16x6	N.D.	1.2	0.4	N.D.	N.D.	0.7
	17x4	N.D.	0.6	N.D.	N.D.	N.D.	0.5
	17x6	N.D.	1.0	0.6	N.D.	N.D.	1.0
	<b>Average (x<sub>2</sub>)</b>	0.0	1.0 (*)	0.2 (*)	0.1 (*)	0.0 (*)	0.5

\* Differences between the two groups were statistically significant

With the aim to find out if significant differences exist among the BTEXS concentrations of the samples closer to the contamination sources compared with those far from them, a statistical study using the Student's t-test (Miller, J. C. & Miller, J. N., 1988) has been accomplished to compare the concentration averages from the two groups. The F-test of equality of variances (Miller et al., 1988) showed a significant difference between the variances of the two groups of olives samples in the case of all compounds, except for styrene. The equations used for the degrees of freedom and the t-experimental are detailed in Supplementary data section along with the detailed results from the statistical study (table III.22).

Table III.22: Detailed values of statistical study by BTEXS concentration obtained from different locations

	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	m-, p-Xylene	o-Xylene	Styrene
Average road samples ( $x_1$ )	0.0	6.0	2.4	3.0	1.9	0.3
Average inside samples ( $x_2$ )	0.0	1.0	0.2	0.1	0.0	0.5
Standard deviation road ( $s_1$ )	0.0	6.7	2.9	3.4	2.9	0.3
Standard deviation inside ( $s_2$ )	0.0	0.5	0.2	0.3	0.0	0.3
Degrees of freedom	-	14	14	14	14	28
$t_{\text{experimental}}$	-	2.85	2.87	3.32	2.52	-1.83
$t_{\text{tabulated}}$	-	2.14	2.14	2.14	2.14	2.05
$\Delta t$	-	0.71	0.73	1.18	0.38	- 3.88

Differences were calculated between the t-experimental and the corresponding t-tabulated for a two-tailed test and a probability of 95% ( $P=0.05$ ). Results are shown in table III.22. Only benzene and styrene did not yield significant differences between the two groups. Concentrations of the rest of studied compounds showed significant differences between the samples close to the road and the samples located inside the plot. The highest difference was found for o-xylene, which appeared in olives samples close to the road, but not in the samples located inside the plot. Actually, the distinctly higher values shown by samples 2x4 and 2x6 for toluene, ethylbenzene and xylenes can be attributed to the position of these olive trees, near to the two roads and, more interestingly, besides the spot where trucks and tractors frequently pull off, which would support the initial hypothesis of the experiment.

### III.3.4.- Conclusions

The calculated processing factors demonstrated that the different compounds tested were not transferred in the same extent from olives to virgin olive oil. Only ethylbenzene and styrene were completely transferred, while for instance benzene was hardly transferred to olive oil due to its relatively high water solubility, so it would be mostly diverted to the aqueous-phase byproduct generated during virgin olive oil production. Besides, it should be kept in mind that an addition that prior to olive oil production steps (malaxation and centrifugations), olives are subjected to a washing step, which may remove partially these compounds. This step was not included in the current study, which was focused on studying the actual behavior during the processing steps.

As regards to the study of the source of BTEXS in olives, low concentration levels were detected in olives samples from the South Spain using HS-GC-MS. The results were within the range considered as background concentrations (up to  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of benzene and  $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for the sum of benzene, toluene, and the  $\text{C}_2$ -benzenes) by other authors. Nevertheless, higher BTEXS concentrations were found in olive samples closer to contamination sources (road or gas stations) compared with samples located far from them. Thus, environmental pollution is evident, but it happens at such very low levels that it does not pose a risk for olive oil safety. Actually, the contribution of this source of contamination is minor if compared with the values of total BTEXS concentration found in virgin olive oil by previous studies. This fact suggests that there may be other relevant sources yet to evaluate apart from that examined in the present article.

---

## III.4.- DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL Y TEÓRICA DE LOS FACTORES DE PROCESADO DE PLAGUICIDAS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

Pendiente de publicación, Mayo de 2017

## RESUMEN

La presencia de residuos de plaguicidas en productos de origen vegetal es regulada mediante el establecimiento de límites máximos de residuos (MRLs). Así, la Unión Europea y el *Codex Alimentarius* establecen tanto criterios para su uso (buenas prácticas agrícolas), como concentraciones máximas permitidas para cada plaguicida utilizado y en cada producto de origen vegetal, principalmente frutas y verduras frescas. Sin embargo, la disponibilidad de MRLs para productos procesados de origen vegetal como puede ser el aceite de oliva, los zumos o el vino es muy limitada. El anexo VI del Reglamento (CE) 396/2005, dedicado al aspecto de factores de procesado o transferencia para productos derivados de origen vegetal está todavía por desarrollar. Como solución provisional se han adoptado factores de procesado por defecto en alimentos como aceite de oliva virgen y vino (Reglamento (UE) 2016/662). En el caso del aceite de oliva virgen, se aplica un factor por defecto de 5 para las sustancias liposolubles, que se corresponde con el rendimiento graso del proceso (20%). Por ejemplo, si a partir de 5 kg de aceituna se obtiene 1 kg de aceite, hay que aplicar un factor 5 para corregir los valores del MRLs establecidos en aceituna. Para aquellas sustancias no liposolubles el factor a aplicar es de 1.

Este planteamiento ignora las diferentes propiedades físico-químicas y comportamiento de cada una de las clases químicas de plaguicidas que se emplean. Además, tampoco especifica cuál es el criterio para distinguir entre sustancias liposolubles y las que no lo son. Con este escenario, se hace necesario el estudio de factores de procesado de plaguicidas que puedan ser transferidos al aceite de oliva durante el proceso de elaboración. Esto permitiría conocer y predecir el comportamiento de los plaguicidas, y así estimar los factores de preconcentración individuales durante la elaboración del aceite de oliva. Esto puede servir, por ejemplo, para un cálculo más preciso y realista de los MRLs para aceite de oliva, con respecto a los establecidos en aceituna.

Para llevar a cabo el estudio, se ha empleado un sistema de extracción de aceite de oliva de dos fases a escala de laboratorio (Abencor). Se han seleccionado un total de 104 plaguicidas de diferentes clases químicas que se emplean a nivel mundial en el cultivo del olivar. Para llevar a

cabo los balances de materia de los plaguicidas durante el proceso, se han realizado los análisis de residuos de plaguicidas en aceitunas previamente fortificadas con los estándares puros, y a su vez, del aceite de oliva producido a partir de éstas. Para ello se emplearon diferentes métodos incluyendo GC-MS/MS y UHPLC-MS/MS para plaguicidas de baja y media polaridad, y HILIC-MS/MS para plaguicidas altamente polares y solubles en agua. Los factores de procesado calculados experimentalmente fueron correlacionados con los valores de coeficiente de reparto octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ), obteniendo una relación lineal con un ajuste razonable teniendo en cuenta las diferentes propiedades físico-químicas de las especies ensayadas. El ajuste fue mucho más preciso cuando se representaron familias concretas de plaguicidas como triazinas, organofosforados o neonicotinoides. Estos resultados pueden emplearse para estimar “ab initio” el factor de procesado y comportamiento de nuevos plaguicidas, permitiendo un cálculo de MRLs en aceite de oliva mucho más ajustado a la realidad, que el que se practica actualmente según el Reglamento (UE) 2016/662, que sólo se basa en el empleo de un rendimiento industrial de un 20% para plaguicidas liposolubles.

El porcentaje de transferencia de los plaguicidas desde la aceituna hasta el aceite de oliva, ha sido evaluado a través del cálculo de factores de procesado, estableciendo dependencias lineales con respecto a sus coeficientes  $\log K_{ow}$ . Con los resultados obtenidos, una ecuación para el cálculo de un MRL en aceite de oliva ha sido propuesta a partir del  $\log K_{ow}$  y sus respectivos MRL en aceituna.

---

#### III.4.- EXPERIMENTAL AND THEORETICAL DETERMINATION OF PESTICIDE PROCESSING FACTORS TO MODEL THEIR BEHAVIOR DURING EXTRA VIRGIN OLIVE OIL PRODUCTION

##### ABSTRACT

The establishment of Maximum Residue Levels (MRLs) of pesticides in raw and processed food is a policy necessary to ensure food safety and thus, to protect consumer health. However, although the procedure to set MRLs in raw food is standardized, the definition of MRLs in processed food is often a matter of discussion. In Europe, a decade after Regulation (CE) 396/2005 became into force, annex VI on MRLs in processed food remains unpublished. Considering this scenario, the purpose of the present work was the experimental evaluation of processing factors of a large set of representative pesticides applied in olive orchards worldwide. The ultimate goal is to understand their behavior during olive oil production and predict their processing factors, which could be eventually used for the calculation of MRLs in olive oil from the MRLs set in olives. A laboratory-scale Abencor system was used for the production of olive oil from olives spiked with the 104 pesticides studied, being three different chromatographic methods used for the analysis of raw olives and the obtained olive oil: (i) gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) for GC-amenable pesticides; (ii) hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) for polar pesticides, and; (iii) reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for low to medium polarity pesticides. The behavior of the pesticides during olive oil extraction was plotted against their polarity using log Kow values, finding a linear relation between the processing factors experimentally calculated and their octanol water partitioning coefficient (log Kow). With this relation set, the processing factors of new pesticides could be estimated and, additionally, an accurate estimation of the actual concentration of pesticides transferred to olive oil from olives could be also made, enabling the calculation of the equivalent MRLs in olive oil from the MRLs in olives, considering the percentage of oil extracted (oil yield) and the log Kow of each pesticide.

### III.4.1.- Introduction

Nowadays, the use of pesticides in crops is widely extended in order to withstand the adverse effects of pests, while, at the same time, pursues an increase of the harvest yields to meet the food demand of the growing global population. However, even trace amounts of pesticides in food can originate health problems. To avoid an inadequate use of pesticides and an unreasonable transfer of them to the processed foodstuffs, several institutions worldwide have established guidelines for good agricultural practices and stringent regulations establishing the maximum concentration of pesticides allowed in foodstuffs. The MRLs set by the European Union (EU), (Reglamento (CE) 396/2005) or the (Codex Alimentarius Commission REP15/CAC, 2015), are a couple of examples. These MRLs have been calculated individually for each foodstuff, depending on the physicochemical properties of the active substances, and on their toxicity. For selected compounds, a default value of  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Reglamento (CE) 149/2008) has been established though. Likewise, MRLs have not been set for some processed foods. In the particular case of virgin olive oils, a default conversion factor of 5 (*viz.* assuming a standard production yield of 20% olive oil from raw olives) for fat soluble substances has been used to convert the MRLs set in olives to an indicative maximum concentration level of pesticide residues authorized in virgin olive oil (Reglamento (UE) 2016/662). However, the actual processing factor (PF) of each pesticide strongly depends on their relative solubility and affinity towards the aqueous phase or to the oily phase during the olive oil production. In the case of non-fat soluble substances, a default oil processing factor of 1 may be used. Thus, the MRL in olive oils should be estimated taking into account the concentration or dilution undergone during olive oil production. In fact, the annex VI of EU (Reglamento (CE) 396/2005) is expected to deliver PFs for each compound in several raw commodities. Unfortunately, to the best of our knowledge this annex has not been yet established. Meanwhile, there is a particular concern from the vegetable oil European industry and its trader suppliers (Fediol & Coceral, 2012).

Given the industrial two-phase extraction used in olive mills and the partitioning undergone by all the olive paste components during malaxation and centrifugation steps, the polarity of the compounds (*eg.* the octanol-water partition coefficient ( $\log K_{ow}$ )) may be a useful parameter to estimate the degree of transfer and, thus, to predict the PFs during olive oil production. Previous studies have calculated PFs in other vegetables crops including tomato (Abou-Arab, 1999; Liu et al., 2014), cucumber (Ramezani & Shahriari, 2015), spinach (Bonnechère et al., 2012), apple (Martin et al., 2013; Li, M., et al., 2015), raisins (Shabeer et al., 2015) and orange (Li, Y., et al., 2012), in cereals such as soybeans (Zhao et al., 2014) and sorghum (Han et al., 2016). However,

---

all these studies have been undertaken for a limited number of pesticides, and with the goal of studying the effect of different steps carried out in the industrial processing such as drying, washing, peeling, hulling, milling, water addition and other processes (Keikotlhaile et al., 2010).

Nevertheless, scarce literature is available on the study of PFs in olive oil. To the best of our knowledge, only one previous study has estimated the PFs for thirteen pesticides in olives and olive oils (Amvrazi & Albanis, 2008). In this study, the objective was to examine the effect of the amount of water added during olive oil production for pesticide abatement, revealing that an increase of water content yielded a decrease of the pesticides transferred. With this scenario in mind, the aim of this work is to examine and tentatively predict of pesticides during olive oil production. For this task, a vast array of 104 commonly used pesticides was selected and the PFs were calculated using a laboratory scale olive mill (Abencor system). Different analytical methods based on gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used for the determination of pesticides in the initial spiked olives and in the olive oil produced with Abencor.

#### III.4.2.- Experimental section

##### III.4.2.1.- Reagents and pesticide standards

HPLC-grade solvents: methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN), ethyl acetate (EtOAc) and n-hexane were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) as well as sodium chloride (NaCl), anhydrous magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ ) and formic acid (HCOOH). Acetic acid (HOAc) was purchased from J.T. Baker (Center Valley, PA, USA). A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA) was used throughout the study to obtain the HPLC-grade water used during the analyses. EMR-Lipid sorbent employed to extract the pesticides was acquired from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). A suite of 104 pesticides were selected (table SD.1, in supplementary data, section III.4.5.), including representative compounds from different families typically used in olive grove, including insecticides, herbicides, fungicides and acaricides. All the analytes are included in latest Annex 1 (last Annex 1/2016) of European Regulation (CE) 396/2005. Analytical standards (>99% purity) of each pesticide were supplied by Sigma-Aldrich or Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Standard solutions of each pesticide ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were prepared in MeOH or MeCN for the analysis by LC-MS/MS and in EtOAc or n-hexane for the compounds analyzed by GC-MS/MS. Mix solutions containing mixtures of the studied compounds ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were prepared in MeCN or n-hexane and stored in amber glass capped vials at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

#### III.4.2.2.- Sample treatment and laboratory-scale olive oil extraction from crushed olives

Olive samples were collected from an olive grove (Jaén, Spain), and stored at -20 °C. Before the sample treatment, olives were crushed using a mill (Talleres Lopera (Priego de Córdoba), Spain). To obtain virgin olive oil samples for the analyses, a portion of olives samples were selected and processed by means of a lab-scale Abencor system (MC2 Ingeniería y sistemas, S.L., Sevilla, Spain) to extract olive oil. Milled samples were weighed (ca. 150 g) and transferred to the malaxater, equipped with thermometer (MC2 model TB-100), where the crushed olive paste was shaken for 30 min at temperature lower than 20.6 °C. Subsequently, the paste obtained was centrifuged during 1 min at 3500 rpm (Abencor centrifuge (MC2 model CF-100)). In this final step, the virgin olive oil was separated from pomace juice and water that constitute the olive, and frozen until the moment to do the analyses.

#### III.4.2.3.- Procedures for pesticide determination in olive oil and olives

##### III.4.2.3.1.- Sample treatment for pesticides with low or medium polarity

The QuEChERS method for pesticides in fatty matrices (AOAC Official Method, 2007), was used with the modification of using a novel sorbent (EMR-Lipid) which provides some advantages in terms of method precision and matrix effects (López-Blanco et al., 2016a). The description of the procedure is detailed in Supplementary data section. For the compounds studied by LC-MS/MS, the method performance in terms of recovery rates was already assessed (López-Blanco et al., 2016a), being the recovery rates obtained used to correct and compensate analyte losses during analysis. In the case of pesticides analyzed by GC-MS/MS, the recovery rates obtained with this sample treatment procedure are included in table SD.2 (supplementary data).

##### III.4.2.3.2.- Sample treatment for polar pesticides

A method for polar pesticides so called QuPPE (Quick Polar Pesticides) was adapted for pesticide analyses of highly polar compounds in both olive oil and olives (EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, 2016). The detailed description is addressed in the Supplementary data section. The method performance in terms of recovery rates was already assessed (Nortes-Méndez et al., 2016), being the recovery rates obtained used to correct and compensate analyte losses during analysis.

---

#### III.4.2.4.- Determination of pesticides in olive oil and olives using LC-MS/MS and GC-MS/MS

From the 104 pesticides selected, 60 pesticides (with low or medium polarity) were analyzed using QuEChERS and UHPLC-MS/MS (Thermo Scientific Quantiva, San José, CA) with a C18 column and a method described elsewhere and detailed in supplementary data section (López-Blanco et al., 2016a), 7 polar pesticides were analyzed with QuPPE and HPLC-MS/MS with a HILIC column (Nortes-Méndez et al., 2016), and the remaining 37 compounds were analyzed by GC-MS/MS using a method described in Supplementary data.

#### III.4.2.5.- Study of processing factors: transfer from spiked olives to olive oil produced by laboratory scale Abencor system

Different batches of crushed olive samples were spiked with different concentrations of each pesticide in the range from 0.5 to 5 mg·kg<sup>-1</sup> depending on method sensitivity and experiment. Then, the olives samples were stirred at room temperature during 60 min helped with a N<sub>2</sub> current to remove the excess of solvent. Afterwards, the olive paste was stored at +4 °C overnight. Before olive oil extraction step, different fractions (n = 6) of the spiked and incubated olive paste were analyzed to assess the homogenization of the paste and also to accurately determine the amount of pesticides present in each sample fraction using the different methodologies described according to the pesticide class and properties. Thereafter, olive oil was extracted from spiked olives using the Abencor system following the procedure described in the section III.4.2.2. Similarly, the olive oil obtained was analyzed to determine the pesticides transferred. The concentration levels detected were calculated for each analyte using matrix-matched calibration curves, and the recovery rate from the extraction procedure for pesticide analysis was used to correct the actual amount of pesticide transferred to the olive oil.

### III.4.3.- Results and discussion

#### III.4.3.1.- Calculation of processing factor through determination of pesticide residue levels during olive oil production

Usually, PFs are applied to account for the effect of food processing on the abatement pesticides residues. The aim of the present article is to establish the relation between residue levels initially present in raw commodities (olives) and the levels remaining in the processed foodstuff after the transformation process (olive oil). The PF is calculated from the concentration levels found in the analyzed olives and olive oil samples from the same production batch. The

olive oil yield (weight fraction of olive oil produced from a batch of olives) and the analyte losses during the measurement of pesticides (sample treatment recovery rate) must be also taken into account, so that any pesticide loss that cannot be attributed to the industrial process itself is compensated in the final PF calculated.

The PF (%) is calculated from pesticide mass balance during olive oil production. It is expressed as the percentage of the residue levels present in the raw commodity (olives) that are detected in the processed product (oil extracted from this one). The calculation of PF is shown in equation II.

$$[II] \quad \text{Processing Factor (\%)} = \frac{[\text{Pesticide}]_{\text{olive oil}}}{[\text{Pesticide}]_{\text{olives}}} * \frac{\text{Recovery}_{\text{olives}}}{\text{Recovery}_{\text{olive oil}}} * \text{oil yield (\%)}$$

where,

**[Pesticide]<sub>olive oil</sub>** is the concentration found in the olive oil extracted

**[Pesticide]<sub>olives</sub>** is the concentration found in the spiked olive paste

**Recovery<sub>olives</sub>** refers to the percentage of compound that is recovered (100% – Recovery (%)<sub>analyte</sub> is the analyte loss) during pesticide extraction and determination step)

**Recovery<sub>olive oil</sub>** refers to the percentage of compound that is recovered (100 – Recovery (%)<sub>analyte</sub> is the analyte loss) during pesticide extraction and determination step)

**Oil yield (%)** refers to the percentage of fat content (olive oil) obtained from the studied olives. It is calculated by weighing the olive oil obtained after Abencor extraction and the initial olives used to produce the olive oil.

The results obtained for the studied pesticides are summarized in table III.23. In addition, the plot of the PFs obtained for each pesticide against their octanol/water coefficient (log K<sub>ow</sub>) is shown in figure III.23. It has to be highlighted that, a linear trend between both parameters was obtained, with a correlation coefficient (r) of 0,7664. The following equation was obtained:  $PF = 12,162 \log K_{ow} + 4,98$ . The correlation is moderate provided the wide range of chemical classes studied.

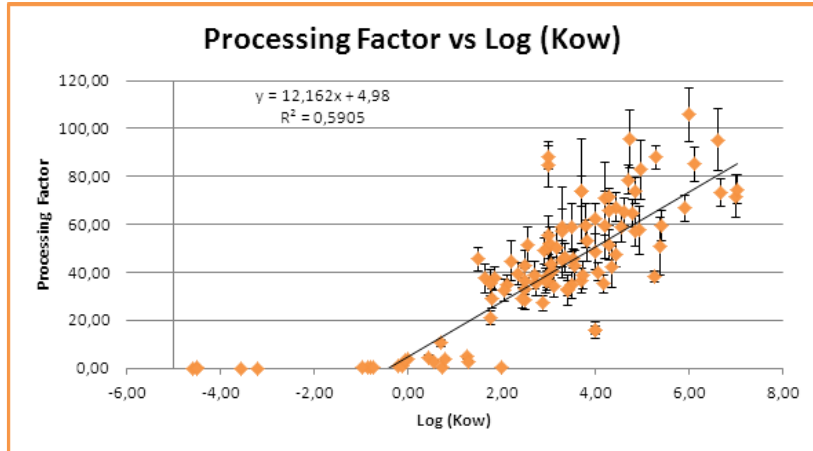


Figure III.23: Plot of processing factors (PF) (%) obtained for each pesticide versus log Kow

Table III.23: Calculation of experimental processing factors (PF (%) n=6, calculated PF (%) using the log Kow overall model, and the PF using the class specific regression equation.

Pesticide	Log Kow	RSD (n=6)	PF (%)	PF theoretical	PF theoretical specific
Diquat	-4.60	-3.82*	NT	NT	NT
Paraquat	-4.50	-0.58*	NT	NT	NT
Fosetyl	-4.50	0.85*	NT	NT	NT
Mepiquat	-3.55	-2.00*	NT	NT	NT
Trimesium	-3.20	-1.74*	NT	NT	NT
Quinmerac	-1.41	-13.43	NT	NT	NT
Amitrol	-0.97	0.42*	NT	NT	NT
Acephate	-0.85	19.10	NT	NT	NT
Methamidophos	-0.80	15.32	NT	NT	NT
Omethoate	-0.74	20.05	NT	NT	NT
Monocrotophos	-0.22	17.47	NT	NT	NT
Thiamethoxam	-0.13	7.86	NT	NT	NT
Cyromazine	-0.07	3.41*	NT	NT	NT
Methomyl	0.01	13.57	NT	NT	NT
Triclorfon	0.43	17.17	NT	NT	NT
Imidacloprid	0.57	16.54	NT	NT	NT
Dimethoate	0.70	13.98	10.37	13.49	17.29
Gibberelic Acid	0.72	26.33	NT	NT	NT
Acetamiprid	0.80	15.74	NT	NT	NT
Thiacloprid	1.26	23.20	NT	NT	NT

Pesticide	Log Kow	RSD (n=6)	PF (%)	PF theoretical	PF theoretical specific
Dodine	1.29	13.86	NT	NT	NT
Thiophanate-methyl	1.45	14.41	NT	NT	NT
Carbendazim	1.50	10.86	45.42	23.22	NA
Fenthion-sulfoxide	1.63	13.92	37.37	24.80	29.66
Fenamiphos-sulfone	1.75	14.36	21.05	26.26	31.31
Metalaxyl	1.75	11.77	35.60	26.26	NA
Carbofuran	1.80	15.83	29.11	26.87	30.23
Terbuthylazine-desethyl	1.85	13.07	37.48	27.48	33.10
Fluroxypyr	2.00	14.54	NT	NT	NT
Malaoxon	2.07	13.56	32.27	30.16	35.51
Simazine	2.10	11.86	34.75	30.52	37.32
Methidathion	2.20	18.73	44.71	31.74	37.24
Carbaryl	2.36	14.55	39.50	33.68	38.65
Norflurazon	2.45	14.91	29.30	34.78	NA
Chlorotoluron	2.50	14.46	28.25	35.39	NA
Isoproturon	2.50	14.88	32.83	35.39	NA
Azoxystrobin	2.50	15.25	36.39	35.39	NA
Atrazine	2.50	11.71	42.95	35.39	44.07
Captan	2.57	13.69	51.68	36.24	NA
Dichlobenil	2.70	14.51	38.89	37.82	NA
Parathion-methyl	2.70	5.50	87.97	37.82	43.89
Dimethomorph	2.72	25.07	35.21	38.06	NA
Spinosyn A	2.80	19.75	15.81	39.03	NA
Diuron	2.87	13.97	27.12	39.88	NA
Malathion	2.92	10.61	48.88	40.49	46.82
Chlorothalonil	2.94	13.70	36.41	40.74	NA
Phosmet	2.96	14.71	36.26	40.98	47.35
Azinphos-methyl	2.96	17.43	38.41	40.98	47.35
Vinclozolin	3.00	12.79	50.07	41.47	NA
Pyrimethanil	3.00	11.32	84.91	41.47	NA
Folpet	3.02	12.87	52.28	41.71	NA
Quizalofop-p-ethyl	3.06	15.18	43.25	42.20	NA
Alachlor	3.09	11.46	40.63	42.56	NA
Iprodione	3.10	14.08	55.46	42.68	NA
Paclobutrazol	3.11	10.69	34.14	42.80	34.07
Azinphos-ethyl	3.18	16.76	50.45	43.66	50.27

Pesticide	Log Kow	RSD (n=6)	PF (%)	PF theoretical	PF theoretical specific
Spinosyn D	3.20	12.11	15.83	43.90	NA
Fenamiphos	3.30	11.11	45.36	45.11	51.87
Procymidone	3.30	15.69	57.23	45.11	NA
Fenitrothion	3.30	28.26	58.96	45.11	51.87
Carfentrazone-ethyl	3.36	9.95	46.14	45.84	NA
Terbuthylazine	3.40	22.86	32.59	46.33	59.25
Kresoxim-methyl	3.40	29.24	33.27	46.33	NA
Fenhexamid	3.51	14.46	34.54	47.67	NA
Benalaxyl	3.54	21.50	45.50	48.03	NA
Tetraconazole	3.56	17.14	42.85	48.28	37.75
Diazinon	3.69	8.79	73.87	49.86	57.06
Tebuconazole	3.70	14.29	36.48	49.98	38.90
Penconazole	3.72	13.98	38.75	50.22	39.06
Lindane	3.80	17.29	58.76	51.20	NA
Pyrazophos	3.80	15.47	59.36	51.20	NA
Parathion	3.83	16.60	53.08	51.56	58.92
Fipronil	4.00	15.65	48.68	53.63	NA
Chlorpyrifos-methyl	4.00	9.90	62.27	53.63	61.18
Chlorfenvinphos	4.04	20.01	40.21	54.11	61.71
Rotenone	4.16	8.92	35.25	55.57	NA
Diflufenican	4.20	23.22	59.73	56.06	NA
Pirimiphos-methyl	4.20	10.80	70.69	56.06	63.84
Ethion	4.28	9.45	65.88	57.03	64.90
Endosulfan-sulfate	4.30	12.22	51.27	57.28	NA
Dicofol	4.30	4.53	71.71	57.28	NA
Difenoconazole	4.36	8.94	42.33	58.01	44.29
Quinalphos	4.44	12.99	47.32	58.98	67.03
Profenophos	4.44	8.89	67.16	58.98	67.03
Tolclofos-methyl	4.56	11.19	58.95	60.44	NA
Tetradifon	4.61	8.47	65.16	61.05	NA
Chlorpyrifos	4.70	7.52	78.55	62.14	70.49
Endosulfan-alfa	4.74	12.51	95.76	62.63	NA
Endosulfan-beta	4.79	9.26	64.59	63.24	NA
Fenthion	4.84	7.46	74.03	63.84	72.35
Oxyfluorfen	4.86	11.23	57.02	64.09	NA
Buprofezin	4.93	14.75	57.52	64.94	NA

Pesticide	Log Kow	RSD (n=6)	PF (%)	PF theoretical	PF theoretical specific
Teflubenzuron	4.98	14.91	82.75	65.55	NA
Trifluralin	5.27	6.35	38.12	69.07	NA
Cypermethrin_(Sum)	5.30	5.50	87.97	69.44	NA
Pyriproxifen	5.37	23.67	50.79	70.29	NA
Bromopropylate	5.40	10.61	59.32	70.65	NA
Cyfluthrin-beta_(Sum)	5.90	8.11	66.65	76.74	NA
Fenpropathrin	6.00	10.51	105.88	77.95	NA
Permethrin (Sum)	6.10	8.48	85.16	79.17	NA
Bifenthrin	6.60	13.41	95.35	85.25	NA
Fenvalerate_(Sum)	6.68	7.80	73.21	86.22	NA
Cyhalothrin-lambda	7.00	12.34	71.74	90.11	NA
Fluvalinate-tau (Sum)	7.02	8.02	74.54	90.36	NA

\*SD was obtained with three replicates for these compounds (n=3)

NT: Not transferred; NA: Not available

As could be expected, highly polar pesticides (with log Kow < 0) displayed negligible transfer rates. This fact is due to their low solubility in nonpolar solvents or environments such as oil. They are mainly distributed in the aqueous phase derived from the water content of olives (olive pomace), which is separated from the oily phase during the centrifugation step.

For the rest of pesticides with log Kow > 0, there is a clear trend to be transferred to the oil phase as the polarity decreases. A breakdown of the graphic obtained according to their classes is shown in figure III.24. Up to five different chemical classes including triazoles, triazines, neonicotinoids, carbamates and organophosphorous were studied. In the case of organophosphorus compounds group, a significant number of them were evaluated across a wide range of polarity (log Kow from - 0.85 to 4.84). The slope of its correlation with log Kow (13,33) was similar to that obtained in the overall equation. Similar results were obtained with triazines and carbamates, which exhibited a slight higher slope. On the other hand, triazoles and neonicotinoids displayed a different behavior, so that an increase of hydrophobicity did not cause such increase of pesticide transfer efficiency for these two classes. This information is interesting as they might have a different consideration when specific MRLs in olive oil are to be set. Other classes such as organochlorines or pyrethroids were also studied. However, a limited number of these pesticide classes was studied, and they had similar octanol/water coefficients (in the first case around log Kow  $\approx$  4.5, and log Kow  $\approx$  6.0 respectively). Therefore, it was not possible to establish a pattern in this case. Similar PF values were obtained for all these analytes with analogous polarities though. Table III.23 includes not only the experimental PFs but also those calculated from the regression equation (using the log Kow values of each individual

pesticide), and also those calculated from the class-specific regression equation when available. Taking into account these results, it can be concluded that, PFs can be roughly modeled using log Kow as variable and might enable the correction of PFs. Compared with the previous work where PF were estimated for eight common pesticides (Amvrazi & Albanis, 2008), the PFs obtained in the current work were slightly higher. This can be partly attributed to the addition of water and the different production process used.

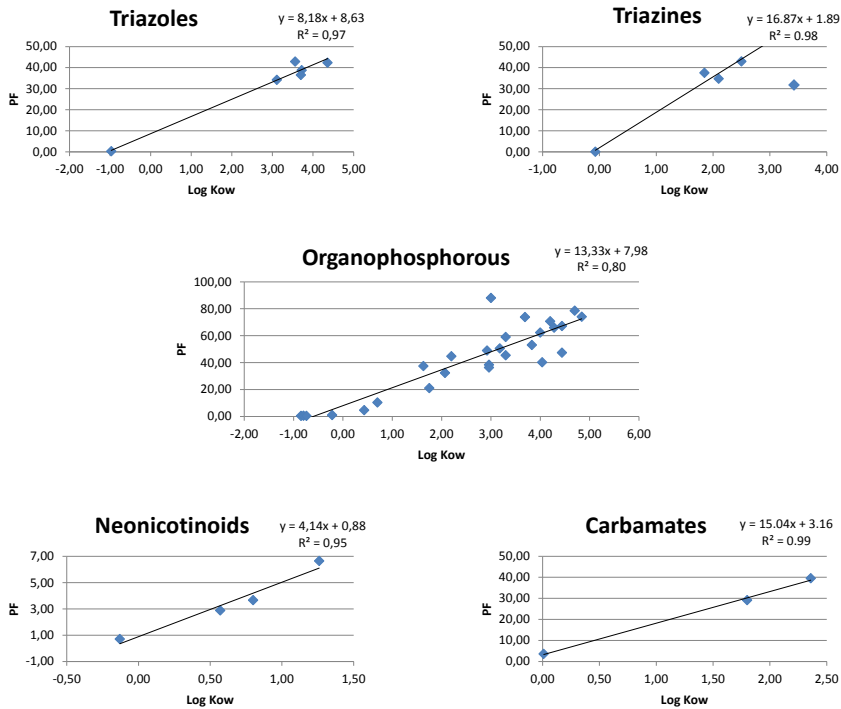


Figure III.24: Class-specific plots of processing factors (PF) (%) obtained for each class versus log Kow

Once PFs were experimentally calculated and a preliminary mathematical model based on the use of log Kow adapted, they can be incorporated to correct experimentally MRL in olive oil. Nowadays, there is only MRL set in olives (for both olives tables and olives intended for olive oil production), whereas, olive oil as a derivate product does not have specific MRLs. The Regulation (UE) 2016/662, establishes default preconcentration factors of 1 or 5 to calculate MRLs. The factor of 5 comes from the assumption of an estimated oil yield of 20% and a completely effective pesticide transfer (100% of PFs) of fat soluble compounds. By contrast, a factor of 1 is applied for those pesticides that are not fat soluble. As demonstrated during this work, all the compounds do not have the same PF. Thus, it would be more reasonable to introduce this

variable in the calculation of MRLs for olive oil, considering the substantial differences of physicochemical properties across the pesticides. A new equation is proposed including the impact of PFs (equation [III]), and expressed using log K<sub>ow</sub> according to the linear regression obtained for the experimental PFs calculated [IV]. The proposed data and the calculated MRLs are included in table III.24. The data reveal that the estimated MRLs are higher than the current default MRLs using the oil yield factor of 20% and assuming the complete transfer of pesticides during olive oil production (Reglamento (UE) 2016/662). None of both premises are met as it was demonstrated in the present study. Thus, the proposed work clearly shows the need to compile data from individual processing factors and address them into the Annex VI of the Regulation (CE) 396/2005.

$$[III] \quad MRL_{olive\ oil} = MRL_{olives} * \frac{100}{oil\ yield} * \frac{100}{[Processing\ factor]}$$

$$[IV] \quad MRL_{olive\ oil} = MRL_{olives} * \frac{10^4}{oil\ yield * [(12.162 * \log K_{ow} + 4.98) \pm 5.2]}$$

Table III.24: PFs (%) and MRLs obtained for each pesticide in olive oil according to the conversion factor of 5 with the proposed equation or the individual experimental PFs calculated

Pesticide	PF (%)	MRL olives <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	MRL olive oil (factor 5) <sup>b</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Calculated MRL olive oil (using log K <sub>ow</sub> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	Experimental MRL olive oil using individual PF (%) (mg kg <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>
Paraquat	NT	0.02	0.1	NT	NT	-4.50
Diquat	NT	0.05	0.25	NT	NT	-4.60
Trimesium	NT	1.00	5	NT	NT	-3.20
Thiophanate-methyl	NT	0.10	0.5	NT	NT	1.45
Mepiquat	NT	0.05	0.25	NT	NT	-3.55
Quinmerac	NT	0.10	0.5	NT	NT	-1.41
Gibberelic Acid	NT	0.01	0.05	NT	NT	0.72
Amitrol	NT	0.05	0.25	NT	NT	-0.97
Omethoate	NT	2.00	10	NT	NT	-0.74
Fosetyl	NT	2.00	10	NT	NT	-4.50
Acephate	NT	0.01	0.05	NT	NT	-0.85
Fluroxypyr	NT	0.05	0.25	NT	NT	2.00

Pesticide	PF (%)	MRL olives <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	MRL olive oil (factor 5) <sup>b</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Calculated MRL olive oil (using log K <sub>ow</sub> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	Experimental MRL olive oil using individual PF (%) (mg kg <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>
Methamidophos	NT	0.01	0.05	NT	NT	-0.80
Thiamethoxam	NT	0.05	0.25	NT	NT	-0.13
Monocrotophos	NT	0.01	0.05	NT	NT	-0.22
Dodine	NT	20.00	100	NT	NT	1.29
Imidacloprid	NT	0.50	2.5	NT	NT	0.57
Cyromazine	NT	0.05	0.25	NT	NT	-0.07
Methomyl	NT	0.02	0.1	NT	NT	0.01
Acetamiprid	NT	0.01	0.05	NT	NT	0.80
Triclorfon	NT	0.01	0.05	NT	NT	0.43
Thiacloprid	NT	4.00	20	NT	NT	1.26
Dimethoate	10.37	2.00	10	86.17	135.60	0.70
Spinosyn A	15.81	0.01	0.05	0.00	0.00	2.80
Spinosyn D	15.83	0.01	0.05	0.00	0.00	3.20
Fenamiphos-sulfone	21.05	0.02	0.1	0.44	0.67	1.75
Diuron	27.12	0.01	0.05	0.15	0.26	2.87
Chlorotoluron	28.25	0.01	0.05	0.16	0.25	2.50
Carbofuran	29.11	0.01	0.05	0.22	0.24	1.80
Norflurazon	29.30	0.01	0.05	0.17	0.24	2.45
Malaoxon	32.27	0.02	0.1	0.39	0.44	2.07
Terbutylazine	32.59	0.05	0.25	0.63	1.08	3.40
Isoproturon	32.83	0.01	0.05	0.16	0.21	2.50
Kresoxim-methyl	33.27	0.20	1	2.51	4.23	3.40
Paclobutrazol	34.14	0.50	2.5	6.79	10.30	3.11
Fenhexamid	34.54	0.05	0.25	0.61	1.02	3.51
Simazine	34.75	0.01	0.05	0.19	0.20	2.10
Dimethomorph	35.21	0.01	0.05	0.15	0.20	2.72
Rotenone	35.25	0.01	0.05	0.10	0.20	4.16
Metalaxyl	35.60	0.05	0.25	1.11	0.99	1.75
Phosmet	36.26	3.00	15	42.56	58.18	2.96
Azoxystrobin	36.39	0.05	0.25	0.82	0.97	2.50
Chlorothalonil	36.41	0.01	0.05	0.14	0.19	2.94

Pesticide	PF (%)	MRL olives <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	MRL olive oil (factor 5) <sup>b</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Calculated MRL olive oil (using log K <sub>ow</sub> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	Experimental MRL olive oil using individual PF (%) (mg kg <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>
Tebuconazole	36.48	0.05	0.25	0.58	0.96	3.70
Fenthion-sulfoxide	37.37	0.01	0.05	0.23	0.19	1.63
Terbutylazine-desethyl	37.48	0.05	0.25	1.06	0.94	1.85
Trifluralin	38.12	0.05	0.25	0.42	0.92	5.27
Azinphos-methyl	38.41	0.05	0.25	0.71	0.92	2.96
Penconazole	38.75	0.05	0.25	0.58	0.91	3.72
Dichlobenil	38.89	0.01	0.05	0.15	0.18	2.70
Carbaryl	39.50	0.01	0.05	0.17	0.18	2.36
Chlorfenvinphos	40.21	0.01	0.05	0.11	0.17	4.04
Alachlor	40.63	0.01	0.05	0.14	0.17	3.09
Difenoconazole	42.33	2.00	10	20.05	33.23	4.36
Tetraconazole	42.85	0.02	0.1	0.24	0.33	3.56
Atrazine	42.95	0.05	0.25	0.82	0.82	2.50
Quinalofop-p-ethyl	43.25	0.05	0.25	0.69	0.81	3.06
Methidathion	44.71	0.02	0.1	0.37	0.31	2.20
Fenamiphos	45.36	0.02	0.1	0.26	0.31	3.30
Carbendazim	45.42	0.10	0.5	2.50	1.55	1.50
Benalaxyl	45.50	0.05	0.25	0.61	0.77	3.54
Carfentrazone-ethyl	46.14	0.01	0.05	0.13	0.15	3.36
Quinalphos	47.32	0.05	0.25	0.49	0.74	4.44
Fipronil	48.68	0.01	0.05	0.11	0.14	4.00
Malathion	48.88	0.02	0.1	0.29	0.29	2.92
Vinclozolin	50.07	0.05	0.25	0.70	0.70	3.00
Azinphos-ethyl	50.45	0.02	0.1	0.27	0.28	3.18
Pyriproxifen	50.79	0.05	0.25	0.41	0.69	5.37
Endosulfan-sulfate	51.27	0.05	0.25	0.51	0.69	4.30
Captan	51.68	0.02	0.1	0.32	0.27	2.57
Folpet	52.28	0.02	0.1	0.28	0.27	3.02
Parathion	53.08	0.05	0.25	0.56	0.66	3.83
Iprodione	55.46	0.02	0.1	0.27	0.25	3.10
Oxyfluorfen	57.02	1.00	5	9.07	12.33	4.86

Pesticide	PF (%)	MRL olives <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	MRL olive oil (factor 5) <sup>b</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Calculated MRL olive oil (using log K <sub>ow</sub> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	Experimental MRL olive oil using individual PF (%) (mg kg <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>
Procymidone	57.23	0.01	0.05	0.13	0.12	3.30
Buprofezin	57.52	5.00	25	44.76	61.13	4.93
Lindane	58.76	0.01	0.05	0.11	0.12	3.80
Tolclofos-methyl	58.95	0.05	0.25	0.48	0.60	4.56
Fenitrothion	58.96	0.01	0.05	0.13	0.12	3.30
Bromopropylate	59.32	0.01	0.05	0.08	0.12	5.40
Pyrazophos	59.36	0.02	0.1	0.23	0.24	3.80
Diflufenican	59.73	0.05	0.25	0.52	0.59	4.20
Chlorpyrifos-methyl	62.27	0.05	0.25	0.54	0.56	4.00
Endosulfan-beta	64.59	0.05	0.25	0.46	0.54	4.79
Tetradifon	65.16	0.01	0.05	0.10	0.11	4.61
Ethion	65.88	0.01	0.05	0.10	0.11	4.28
Cyfluthrin-beta_(Sum)	66.65	0.02	0.1	0.15	0.21	5.90
Profenophos	67.16	0.02	0.1	0.20	0.21	4.44
Pirimiphos-methyl	70.69	0.05	0.25	0.52	0.50	4.20
Dicofol	71.71	0.05	0.25	0.51	0.49	4.30
Cyhalothrin-lambda	71.74	1.00	5	6.45	9.80	7.00
Fenvalerate_(Sum)	73.21	0.02	0.1	0.13	0.19	6.68
Diazinon	73.87	0.01	0.05	0.12	0.10	3.69
Fenthion	74.03	0.01	0.05	0.09	0.09	4.84
Fluvalinate-tau (Sum)	74.54	0.01	0.05	0.06	0.09	7.02
Chlorpyrifos	78.55	0.05	0.25	0.47	0.45	4.70
Teflubenzuron	82.75	0.05	0.25	0.44	0.42	4.98
Pyrimethanil	84.91	0.02	0.1	0.28	0.17	3.00
Permethrin (Sum)	85.16	0.05	0.25	0.37	0.41	6.10
Parathion-methyl	87.97	0.01	0.05	0.15	0.08	2.70
Cypermethrin_(Sum)	87.97	0.05	0.25	0.42	0.40	5.30
Bifenthrin	95.35	0.05	0.25	0.34	0.37	6.60
Endosulfan-alfa	95.76	0.05	0.25	0.46	0.37	4.74
Fenpropathrin	105.88	0.01	0.05	0.07	0.07	6.00

#### III.4.4.- Conclusions

Currently, the general procedure for the establishment of MRLs for pesticides in olive oil is the application of a factor (a default oil yield (%) of 20%) to the MRL existing for the raw commodity (Reglamento (UE) 2016/662). Pesticide PFs not only depends on the industrial process and their yields, but also on the singular physicochemical properties of each pesticide. In the present work, the PFs of 104 pesticides of a wide range of polarity have been calculated during olive oil production at laboratory scale. A linear dependence between the log Kow and the PF (%) has been established. The proposed model based on log Kow have shown significant differences on the behavior of pesticides. Lipophilic pesticides will be transferred to the oil phase in a higher extent than the hydrophilic ones, whose concentrations are negligible as they are mostly transferred to the water phase in a higher extent (olive pomace). This behavior may be considered in the calculation of MRLs in processed food by means of PFs.

---

### III.4.5.- Supplementary data

#### Procedures

**Sample treatment for pesticides with low or medium polarity.** Briefly, a homogenized portion of 10 g of olives samples (in the case of olive oil, 3 g of oil + 7 mL H<sub>2</sub>O Milli-Q) was weighed into 50 mL centrifuge tube; 10 mL MeCN (1% HOAc) were added together with 4 g of MgSO<sub>4</sub> and 1 g of NaCl and immediately was shaken for 1 min. The mixture was centrifuged during 5 min at 2655 *g*. For the clean-up step, 1 g of EMR-Lipid sorbent was activated with 5 mL of H<sub>2</sub>O Milli-Q prior to use it. Afterwards, 5 mL of the upper layer (MeCN) was added into the centrifuge tube and shaken for 1 min and then centrifuged at 2655 × *g* for 5 min. A clean-up step was carried out transferring 5 mL of the before centrifuged extract with a second centrifuge tube, which contained 1.6 g of MgSO<sub>4</sub> and 0.4 g of NaCl being shaken and centrifuged again. Then, this organic extract was diluted 1:10 by dissolving 100 µL of each extract with 900 µL of H<sub>2</sub>O in the case of pesticides analyzed by LC, whereas 100 µL of each extract was dissolved with 200 µL of EtOAc and 700 µL of n-hexane for pesticides analyzed by GC. Finally, the final extract was filtered through 0.45 µm pore diameter filter.

**Sample treatment for polar pesticides (QuPPE).** A representative portion of olive oil sample of 10 g was weighed into a 50 mL centrifuge tube. Afterwards, 10 mL of MeOH (1% HCOOH) was added together with 10 mL of H<sub>2</sub>O Milli-Q and immediately shaken for 1 min. An intermediate heating step was implemented to quantitatively extract diquat and paraquat (80°C during 15 min). Once the mixture reached the ambient temperature, was shaken for 1 min and thereupon it was centrifuged during 3 min at 1301 × *g*. Finally, an aliquot of 1 mL of aqueous phase (the highest density phase), was diluted with 4 mL MeCN (1% HCOOH), achieving a dilution factor of 10. Last, and prior the analysis, the final extract was filtered through 0.45 µm pore diameter filter.

**Determination of pesticides by liquid chromatography tandem mass spectrometry.** Two LC methods were used, one of them for polar pesticides (HILIC-MS/MS) and other for pesticides with lower or moderate polarity using a C18 column. LC-MS/MS were carried out with an UHPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, USA) instrument. The UHPLC system was coupled to a TSQ Quantiva triple quadrupole (QqQ) (Thermo, Scientific, USA) equipped with a heated electrospray ionization probe (HESI) operating in positive and negative ion mode. The analytical parameters were the following: spray voltage, 3500 V; sheath gas, 45 arbitrary units (a.u.); aux gas, 13 a.u.; ion transfer tube temperature 342 °C; collision gas (CID gas) 1.5 mTorr.

Xcalibur software 4.0.27.10 was used for method development, whereas Tracefinder software 3.2.5.12.0 (Thermo Scientific, USA) was employed for data analysis. Mass spectrometry conditions and multiple reaction monitoring (MRM) transitions were optimized individually for each pesticide.

**Determination of pesticides by reversed phase LC-MS/MS.** The separation of the nonpolar and low polarity analytes was carried out with an Agilent Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) Eclipse Plus C18 column (2.1 mm x 50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$  particle size).  $\text{H}_2\text{O}$  and MeCN were used as mobile phases both with 0.1% of formic acid at a flow rate of  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The temperature of column was  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  and the injection volume was  $10 \text{ }\mu\text{L}$ . The gradient profile held the initial mobile phase composition (5% MeCN) constant flow 3 min, followed by a linear gradient to 100% MeCN up to 18 min, holding this concentration for two additional minutes.

**Determination of polar pesticides by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS).** In order to carry out the separation of polar pesticides (amitrol, cyromazine, diquat, fosetyl, mepiquat, paraquat and trimesium) an Agilent Zorbax RRHD HILIC Plus column (2.1 mm x 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$  particle size) was employed. Mobile phases were  $\text{H}_2\text{O}$  and MeCN:  $\text{H}_2\text{O}$  was adjusted with ammonium formate (100 mM) and pH of 2.85 using formic acid, and MeCN with 0.1% of formic acid (v/v). The initial conditions of the chromatographic method started with aqueous phase 90% and a flow rate of  $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . During the first 10 min a linear progression was held until to hit 80% of  $\text{H}_2\text{O}$ , then it was decreased until 40% and a flow of  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  in 3 min. The last step was kept it during 3 min more being a total time of the analysis of 16 min.

**Determination of pesticides by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS).** The rest of target pesticides (37) were analyzed by means of GC-MS technique. The optimum analytical parameters for each compound were evaluated individually. In order to choose the ideal voltage for each compound a fragmentation study was carried out. A Focus gas chromatograph (Thermo Scientific, USA) equipped with a Varian FactorFour VF-5 ms capillary column of  $30.0 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$  i.d. and  $0.25 \text{ }\mu\text{m}$  of film size (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) was used for chromatographic separation. As carrier gas was employed helium with a flow rate of  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The injection volume of sample was of  $4 \text{ }\mu\text{L}$  in mode splitless with surge pressure ( $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  during 1 min and 250 kPa during 0.5 min respectively). A splitless liner (5mm i.d.) covered with carbofrit was coupled in the injection port. A gradient of temperature was employed for the separation of the compounds, being the initial temperature established at  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  and hold during 2 min. Afterwards, a first ramp with a rate of  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  was applied up to achieve  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ . Once it was remained during 5 min, the temperature was increased with a second raise up of  $6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  until at  $260 \text{ }^\circ\text{C}$ , straightaway a new ramp was applied with a rate of

---

4 °C·min<sup>-1</sup> to achieve 300 °C, remaining constant during 2 min. The gas chromatograph was connected through a transfer line (at 300 °C) with a mass spectrometer Polaris Q-Ion Trap (Thermo Scientific, USA). The ionization of compounds was carried out by means of electron impact operating at 70 eV. A filament current of 250 µA and a multiplier voltage of 1638 V were used in MS mode. Specific MS/MS transitions were recorded for each pesticide analyzed with a scan event time of 0.39 s. Xcalibur software 2.0 (Thermo Scientific, USA) was used in order to development of the analytical method and data processed (table SD.3).

Table SD.1: Features of all compounds studied and analytical technique employed

Pesticide	Elemental composition	Pesticide class	Method selected
Acephate	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Acetamiprid	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	Neonicotinoide	RP-LC
Alachlor	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub>	Chloroacetamide	RP-LC
Amitrol	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	Triazole	HILIC-LC
Atrazine	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	Triazine	RP-LC
Azinphos-ethyl	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	Organophosphorous	GC
Azinphos-methyl	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	Organophosphorous	RP-LC
Azoxystrobin	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	Strobilurin	RP-LC
Benalaxyl	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	Acylalanine	RP-LC
Bifenthrin	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Pyrethroid	GC
Bromopropylate	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Benzilate	GC
Buprofezin	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> OS	-	RP-LC
Captan	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> S	Phthalimide	GC
Carbaryl	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Carbamate	RP-LC
Carbendazim	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Benzimidazole	RP-LC
Carbofuran	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	Carbamate	RP-LC
Carfentrazone-ethyl	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	Triazolinone	RP-LC
Chlorfenvinphos	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	Organophosphorous	RP-LC
Chlorothalonil	C <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	Chloronitrile	GC
Chlorotoluron	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	Urea	RP-LC
Chlorpyrifos	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	GC
Chlorpyrifos-methyl	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	GC
Cyhalothrin-λ	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	Pyrethroid	GC
Cyfluthrin-β	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>3</sub>	Pyrethroid	GC
Cypermethrin	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	Pyrethroid	GC
Cyromazine	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub>	Triazine	HILIC-LC
Diazinon	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	GC
Dichlobenil	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N	Benzonitrile	GC
Dicofol	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> O	Organochlorine	GC

Pesticide	Elemental composition	Pesticide class	Method selected
Difenoconazol	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	Triazole	RP-LC
Diflufenican	C <sub>19</sub> H <sub>11</sub> F <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Pyridinecarboxamide	RP-LC
Dimethoate	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	Organophosphorous	RP-LC
Dimethomorph	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>	Cinnamic acid	RP-LC
Diquat	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> <sup>+2</sup>	Bipyridyliu	HILIC-LC
Diuron	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	Urea	RP-LC
Dodine	C <sub>15</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Guanidine	RP-LC
Endosulfan-sulfate	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	Organochlorine	GC
Endosulfan-α	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	Organochlorine	GC
Endosulfan-β	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	Organochlorine	GC
Ethion	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	Organophosphorous	GC
Fenamiphos	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Fenamiphos-sulfone	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Fenhexamid	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	Hydroxyanilide	RP-LC
Fenitrothion	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> PS	Organophosphorous	GC
Fenpropathrin	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	Pyrethroid	GC
Fenthion	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	Organophosphorous	RP-LC
Fenthion-sulfoxide	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	Organophosphorous	RP-LC
Fenvalerate	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>	Pyrethroid	GC
Fipronil	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS	Phenylpyrazole	GC
Fluroxypyr	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Pyridinecarboxylic acids	RP-LC
Fluvalinate-τ	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Pyrethroid	GC
Folpet	C <sub>9</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> S	Phthalimide	GC
Fosetyl	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> P	-	HILIC-LC
Gibberellic Acid	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	-	RP-LC
Imidacloprid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	Neonicotinoide	RP-LC
Iprodione	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dicarboximide	GC
Isoproturon	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	Urea	RP-LC
Kresoxim-methyl	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	Strobilurin	RP-LC
Lindane	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	Organochlorine	GC

Pesticide	Elemental composition	Pesticide class	Method selected
Malaoxon	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Malathion	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	Organophosphorous	RP-LC
Mepiquat	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sup>+</sup>	Quaternary ammonium	HILIC-LC
Metalaxyl	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	Acylalanine	RP-LC
Methamidophos	C <sub>2</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Methidathion	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	Organophosphorous	GC
Methomyl	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	Oxime carbamate	RP-LC
Monocrotophos	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> P	Organophosphorous	RP-LC
Norflurazon	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	Pyridazinone	RP-LC
Omethoate	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Oxyfluorfen	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	Diphenyl ether	GC
Paclobutrazol	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O	Triazole	RP-LC
Paraquat	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> <sup>+2</sup>	Bipyridylum	HILIC-LC
Parathion	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> PS	Organophosphorous	GC
Parathion-methyl	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>5</sub> PS	Organophosphorous	GC
Penconazol	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	Triazole	RP-LC
Permethrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Pyrethroid	GC
Phosmet	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	Organophosphorous	RP-LC
Pirimiphos-methyl	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Procyimidone	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	Dicarboximide	GC
Profenofos	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> BrClO <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	GC
Pyrazophos	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> PS	Phosphorothiolate	GC
Pyrimethanil	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	Anilinopyrimidine	RP-LC
Pyriproxifen	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	Juvenile hormon mimic	GC
Quinalphos	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	Organophosphorous	RP-LC
Quinmerac	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> ClNO <sub>2</sub>	Quinolinecarboxylic acid	RP-LC
Quizalofop-p-ethyl	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ariloxifenoxi propionato	RP-LC
Rotenone	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	Rotenoide	RP-LC
Simazine	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	Triazine	RP-LC
Spinosyn A (Spinosad)	C <sub>41</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>10</sub>	Spinosyn	RP-LC

Pesticide	Elemental composition	Pesticide class	Method selected
Spinosyn D (Spinosad)	C <sub>42</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>10</sub>	Spinosyn	RP-LC
Tebuconazole	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	Triazole	RP-LC
Teflubenzuron	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Benzoylurea	RP-LC
Terbutylazine	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	Triazine	RP-LC
Terbutylazine-desethyl	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	Triazine	RP-LC
Tetraconazole	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	Triazole	RP-LC
Tetradifon	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	-	GC
Thiacloprid	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S	Neonicotinoid	RP-LC
Thiamethoxam	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	Neonicotinoid	RP-LC
Thiophanate-methyl	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	Benzimidazole	RP-LC
Tolclofos-methyl	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	Aromatic hydrocarbon	GC
Trichlorfon	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	Organophosphorous	RP-LC
Trifluralin	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Dinitroaniline	GC
Trimethyl-sulfonium	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> S <sup>+</sup>	Glyphosate counterion	HILIC-LC
Vinclozolin	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	Dicarboximide	GC

Table SD.2: Analytical parameters of method development for GC-MS/MS analysis

Pesticide	Retention time (min)	Precursor ion [M+H] <sup>+</sup>	q1	q2	CE
Methamidophos	8.79	140.9	125.98	95.05	0.60
Dichlobenil	10.30	170.9	136.05	100.16	1.50
Trifluralin	14.41	263.9	206	160.08	1.00
Thiometon	15.43	125.07	79.02	62.04	1.00
Lindane	16.53	218.73	183.97	-	1.00
Lindane	16.53	180.9	145.06	-	1.25
Diazinon	16.91	179	137.17	164.11	1.50
Chlorothalonil	17.32	265.9	231.01	205.1	1.50
Chlorpyrifos-methyl	19.31	285.8	270.95	240.98	1.25
Vinclozolin	19.54	211.9	172.02	145.08	1.25
Parathion-methyl	19.65	232.9	124.06	201.09	1.25
Tolclofos-methyl	19.65	264.9	249.99	220.1	1.25
Fenitrothion	20.82	246.9	138.09	106.19	1.00
Chlorpyrifos	21.45	313.8	285.86	258.03	0.75
Parathion	21.83	124.9	97.02	93.09	1.00
Diclofop	22.40	279.95	251.05	182.24	1.00
Fipronil	23.13	367.03	245.1	255.07	1.25
Captan	23.58	148.9	105.12	79.17	0.75
Procymidone	23.67	282.8	255.09	220.15	1.00
Folpet	23.80	259.8	231.96	130.08	0.75
Methidathion	24.05	144.8	85.04	58.13	0.50
Endosulfan- $\alpha$	24.54	206.89	172.1	136.06	2.00
Profenofos	25.31	336.8	308.95	266.93	0.75
Oxyfluorfen	25.76	252.16	196.1	224.13	1.75
Endosulfan- $\beta$	26.73	194.83	159.09	123.06	1.75
Ethion	26.94	230.8	202.88	174.95	0.75
Endosulfan sulfate	28.06	387	288.97	253.04	1.25
Iprodione	29.61	313.9	245.07	271.03	1.00
Bifenthrin	29.82	180.9	166.16	153.3	1.00
Bromopropylate	29.89	340.77	185.07	155.12	1.00
Fenpropathrin	30.16	264.99	210.12	172.12	1.00

Pesticide	Retention time (min)	Precursor ion [M+H] <sup>+</sup>	q1	q2	CE
Dicofol	30.19	138.9	111.12	93.02	1.25
Tetradifon	30.76	226.83	198.99	164.04	1.25
Cyhalothrin-lambda	31.53	208.9	141.21	169.19	1.00
Pyrazophos	31.85	221	193.08	149.16	1.00
Azinphos-ethyl	32.09	132	77	104.1	1.00
Permethrin 1	32.94	183	168.14	153.27	1.25
Permethrin 2	33.19	183	168.14	153.27	1.25
Cyfluthrin-β1	34.28	206	151.14	179.11	1.50
Cyfluthrin-β2	34.37	206	151.14	179.11	1.50
Cypermethrin 1	34.59	208.9	193.05	141.13	1.25
Cypermethrin 2	34.81	208.9	193.05	141.13	1.25
Cypermethrin 3	34.90	208.9	193.05	141.13	1.25
Cypermethrin 4	34.99	208.9	193.05	141.13	1.25
Fenvalerate 1	36.32	224.9	147.01	119.07	1.00
τ-Fluvalinate 1	36.55	250	200.14	215.07	1.25
τ-Fluvalinate 2	36.71	250	200.14	215.07	1.25
Fenvalerate 2	36.74	224.9	147.01	119.07	1.00
Esfenvalerate	36.75	224.9	147.03	119.08	0.90

Table SD.3: Recovery rates (RR) and relative standard deviation obtained in the preliminary analysis by GC-IT (n=6)

Pesticide	RR (%)	RSD (n=6)
Azinphos-ethyl	109.53	10.86
Bifenthrin	31.12	2.02
Bromopropylate	65.85	10.12
Captan	99.32	8.47
Chlorothalonil	76.96	5.68
Chlorpyrifos	60.65	6.48
Chlorpyrifos-methyl	73.68	4.30
Cyfluthrin-beta_(Sum)	70.53	7.40
Cyhalothrin-lambda	77.71	27.44
Cypermethrin_(Sum)	53.31	5.88
Diazinon	83.22	29.95
Dichlobenil	99.73	2.30
Dicofol	51.02	10.44
Endosulfan-alfa	29.17	16.49
Endosulfan-beta	63.23	8.28
Endosulfan-sulfate	101.50	10.42
Ethion	81.24	7.10
Fenitrothion	120.67	14.58
Fenpropathrin	45.79	1.99
Fenvalerate_(Sum)	56.77	3.84
Fipronil	118.80	7.63
Fluvalinate-tau (Sum)	57.54	3.38
Folpet	90.39	5.73
Iprodione	106.48	11.51
Lindane	61.37	11.18
Methidathion	120.74	5.68
Oxyfluorfen	83.99	5.64
Parathion	100.54	4.96
Parathion-methyl	112.97	2.09
Permethrin (Sum)	36.31	3.15

---

Procymidone	95.44	10.65
Profenophos	65.99	9.76
Pyrazophos	98.01	11.86
Tetradifon	54.35	5.08
Thiometon	78.99	8.18
Tolclofos-methyl	80.71	9.35
Trifluralin	66.85	5.43
Vinclozolin	103.89	7.46



---

# Conclusiones

---



## **IV. CONCLUSIONES**

En esta tesis se han desarrollado una serie de investigaciones enfocadas al estudio de la potencial transferencia de residuos de plaguicidas y compuestos aromáticos, como los BTEXS, desde la aceituna hasta el aceite de oliva durante el proceso de elaboración del mismo. Los resultados obtenidos han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. El empleo de técnicas híbridas cromatografía-espectrometría de masas —tanto UHPLC-MS/MS como GC-MS/MS— permite el desarrollo de metodologías analíticas adecuadas para la determinación de plaguicidas con un amplio rango de polaridad, y de BTEXS. Estos métodos desarrollados son suficientemente sensibles como para proporcionar límites de cuantificación inferiores a los valores máximos de concentración permitidos (MRLs) en las normativas establecidas.

2. Se ha comprobado que el empleo de un nuevo sorbente, (EMR-Lipid), utilizado en la etapa de purificación del extracto durante el tratamiento de muestra para el análisis de matrices de alto contenido graso (aceite de oliva, aceituna y aguacate), proporciona una mejora significativa con respecto a otros sorbentes que han venido utilizándose en la última década. Esta modificación en la etapa de purificación del procedimiento QuEChERS permite un aumento de los porcentajes de recuperación de los analitos, una disminución de los efectos matriz de las muestras, una mayor limpieza en los extractos obtenidos, así como una mejora en la precisión global del método.

3. El estudio sobre la presencia de BTEXS en muestras de aceituna obtenidas de diferentes parcelas de cultivos próximas a potenciales focos de contaminación, ha revelado unas concentraciones muy bajas. No obstante, se han encontrado diferencias significativas entre muestras cercanas a fuentes de contaminación y las que están más alejadas, consecuencia que se atribuye a la contaminación ambiental. Sin embargo, dadas las bajas concentraciones encontradas, en principio no debe existir preocupación desde el punto de vista de la exposición por el consumo de aceite de oliva. El estudio de los factores de procesado revela ciertas diferencias en el comportamiento de cada uno de los BTEXS.

4.- El estudio de los factores de procesado llevado a cabo para 104 plaguicidas ha permitido establecer el porcentaje de transferencia de cada una de las familias de plaguicidas más comúnmente encontradas en el olivar. Pese a que el comportamiento que presentan los plaguicidas es dispar, debido a sus diferentes propiedades físico-químicas, como primera aproximación se puede establecer un modelo basado en la hidrofobicidad de los mismos a través

del coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ). Se ha encontrado una correlación lineal entre los factores de procesado calculados y el  $\log K_{ow}$  de cada plaguicida y ésta puede servir para — en una primera instancia— predecir y estimar el factor de procesado de nuevos plaguicidas. Esto permitiría ajustar los valores de MRL en aceite de oliva a partir de los correspondientes  $\log K_{ow}$  y MRL en aceituna, en lugar del valor por defecto que actualmente se aplica, dónde sólo se tiene en cuenta el rendimiento graso de la materia prima.

---

---

# Bibliografía

---



## V. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Arab, A. A. K. (1999). Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. *Food Chemistry*, 65(4), 509-514.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Recuperado 8 de marzo de 2017, a partir de: <https://www.atsdr.cdc.gov/es/>
- Agilent Technologies Inc. (2016a). Multiresidue analysis of pesticides in avocado with Agilent. Recuperado a partir de:  
<http://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6098EN.pdf>
- Agilent Technologies Inc. (2016b). Recommended protocols for Enhanced Matrix Removal-Lipid. Recuperado a partir de:  
<https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-6057EN.pdf>
- Alberici, R. M., Zampronio, C. G., Poppi, R. J., & Eberlin, M. N. (2002). Water solubilization of ethanol and BTEX from gasoline: on-line monitoring by membrane introduction mass spectrometry. *Analyst*, 127(2), 230-234.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., & Vieth, B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS. *Mass spectrometry reviews*, 25(6), 838-865.
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 499(C), 177-196.
- Amvrazi, E. G., & Albanis, T. A. (2006). 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, 9642-9651.
- Amvrazi, E. G., & Albanis, T. A. (2008). 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(14), 5700-5709.
- Amvrazi, E. G., & Albanis, T. A. (2009). Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry*, 113(1), 253-261.
-

- Anagnostopoulos, C., & Miliadis, G. E. (2013). Development and validation of an easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC-MS/MS and LC-MS/MS in olive oil and olives. *Talanta*, *112*, 1-10.
- Annastasiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solid-phase extraction» for the determination of pesticide residues in produce. *Journal AOAC International*, *86*, 412-431.
- AOAC Official Method 2007.01, I. (2007). AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, *90*(2), 17-26.
- Aparicio, R. & Harwood, J. (2003). *Manual del aceite de oliva* (1ª Ed.). Madrid (España): Ediciones Mundi-Prensa.
- Aramendía, M. A., Borau, V., Lafont, F., Marinas, A., Marinas, J. M., Moreno, J. M., Porras, J. M. & Urbano, F. J. (2006). Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (MRM). *Food Chemistry*, *97*(1), 181-188.
- Aramendía, M. A., Borau, V., Lafont, F., Marinas, A., Marinas, J. M., Moreno, J. M., & Urbano, F. J. (2007). Determination of herbicide residues in olive oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *105*(2), 855-861.
- Avramides, E. J. (2006). A multi-residue gas chromatographic method for the determination of insecticides in olive fruits. *European Pesticide Residue Workshop (EPRW)*.
- Biedermann, M., Grob, K., & Morchio, G. (1995). On the origin of benzene toluene ethylbenzene and xylene in extra virgin olive oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, *200*(4), 266-272.
- Biedermann, M., Grob, K., & Morchio, G. (1996). On the origin of benzene , toluene, ethylbenzene and xylene in extra virgin olive oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, *203*(3), 224-229.
- Bonnechère, A., Hanot, V., Jolie, R., Hendrickx, M., Bragard, C., Bedoret, T., & Van Loco, J. (2012). Effect of household and industrial processing on levels of five pesticide residues and two degradation products in spinach. *Food Control*, *25*(1), 397-406.
-

- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Melis, M., Pirisi, F. M., & Minelli, E. V. (1997). Effect of Epicuticular Waxes of Fruits on the Photodegradation of Fenthion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3681-3683.
- Carpenter, R., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, M. N., Kerry, J. P., & O'Brien, N. M. (2006). Modulatory effects of resveratrol, citroflavan-3-ol, and plant-derived extracts on oxidative stress in U937 cells. *Journal of Medicinal Food*, 9(2), 187-95.
- Carrillo-Carrión, C., Lucena, R., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2007). Liquid-liquid extraction/headspace/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene, (o-, m- and p-)xylene and styrene in olive oil using surfactant-coated carbon nanotubes as extractant. *Journal of Chromatography A*, 1171(1-2), 1-7.
- Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy*, 9(7-8), 685-692.
- Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M. C., Poulsen, H. E., Nyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J. T., De la Torre-Carbot, K., Zunft, H. F., De la Torre, R., Bäumer, H., Gaddi, A., V., Saez, G. T., Tomás, M., & Covas, M. I. (2011). The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 30(4), 490-493.
- Cavalli, J. F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., & Loiseau, A. M. (2003). Comparison of Static Headspace, Headspace Solid Phase Microextraction, Headspace Sorptive Extraction, and Direct Thermal Desorption Techniques on Chemical Composition of French Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7709-7716.
- Cavalli, J. F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., & Loiseau, A. M. (2004). Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chemistry*, 88(1), 151-157.
- Cela, R., Lorenzo, R. A., & Casais, M. C. (2002). *Técnicas de separación en Química analítica* (1ª Ed.). Madrid (España): Editorial Síntesis.
- Chamkasem, N., Ollis, L. W., Harmon, T., Lee, S., & Mercer, G. (2013). Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2315-2329.

- Codex Alimentarius Commission. (2015). Joint FAO/WHO food standards programme. *REP15/CAC July, Thirty-eight session*.
- COI, (2016). Consejo Oleícola Internacional. *Norma comercial COI/t.15/nº 3/Rev. 10*, 1-18. Recuperado a partir de <http://www.internationaloliveoil.org>
- Comité de Agricultura (FAO) COAG/2003/6. (2003). Elaboración de un marco para las buenas prácticas agrícolas. *Depósito de documentos de la FAO*.
- Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Beatriz, M., & Oliveira, P. P. (2007a). Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 73(3), 514-522.
- Cunha, S. C., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2007b). Evaluation of the QuECHERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science*, 30(4), 620-632.
- Delgado-Lista, J., López-Miranda, J., Cortés, B., Pérez-Martínez, P., Lozano, A., Gómez-Luna, R., Gómez, P., Gómez, M. J., Criado, J., Fuentes, F., & Pérez-Jiménez, F. (2008). Chronic dietary fat intake modifies the postprandial response of hemostatic markers to a single fatty test meal. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2), 317-322.
- Directiva 2002/657/CE. (2002). En cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L221, 8-36.
- Directiva 76/895/CEE. (1976). Relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 11, 84-89.
- Directiva 86/362/CEE. (1986). Relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los cereales. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L221, 37-42.
- Directiva 86/363/CEE. (1986). Relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L221, 43-47.
- Directiva 89/107/CEE. (1989). Aproximación de las legislaciones de los estados miembros sobre aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L40, 27-33.
-

- Directiva 90/642/CEE. (1990). Relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L350, 71-79.*
- Directiva 91/414/CEE. (1991). Relativa a la comercialización de los productos fitosanitarios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L230, 1-32.*
- Esparza, X., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2009). Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. *Journal of Chromatography A, 1216(20), 4402-4406.*
- Esteve-Turrillas, F. A., Pastor, A., & De La Guardia, M. (2005). Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta, 553(1-2), 50-57.*
- Estruch, R., Martínez-González, M. Á., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M. I., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., López-Sabater, M. C., Vinyoles, E., Arós, F., Conde, M., Lahoz, C., Lapetra, J., Sáez, G., & Ros, E. (2006). Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors. *Annals of Internal Medicine, 145(1), 1-15.*
- EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, (2016). Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method) Content quise, 2(October), 1-68.
- European Reference Laboratories Portal, (2016). Section dedicated to the SRM-Compounds methods. Recuperado a partir de:  
[http://www.crl-pesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?LabID=200&CntID=670&Lang=EN](http://www.crl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?LabID=200&CntID=670&Lang=EN)
- FAO, (2017). *Manual de la FAO sobre la presentación y evaluación de los datos sobre residuos de plaguicidas para la estimación de los límites máximos de residuos en alimentos y piensos* (3ª Ed.). Roma (Italia).
- FAO/OMS, (1999). *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento* (10ª Ed.). Roma (Italia).
- Fediol and Coceral, (2012). Letter "Request for EU-harmonized processing factors applied to vegetable oils and fats products coming from crushing and refining", (April).

Recuperado a partir de:

[http://www.mvo.nl/media/12saf076\\_fediol\\_coceral\\_letter\\_to\\_p\\_testori\\_on\\_eu\\_processing\\_factors\\_in\\_vegetable\\_oils\\_fats\\_16\\_april\\_1\\_\\_1\\_.pdf](http://www.mvo.nl/media/12saf076_fediol_coceral_letter_to_p_testori_on_eu_processing_factors_in_vegetable_oils_fats_16_april_1__1_.pdf)

Fernández Moreno, J. L., Arrebola Liébanas, F. J., Garrido Frenich, A., & Martínez Vidal, J. L. (2006). Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1111(1), 97-105.

Ferrer, C., Gómez, M. J., García-Reyes, J. F., Ferrer, I., Thurman, E. M., & Fernández-Alba, A. R. (2005). 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. *Journal of Chromatography A*, 1069(2), 183-194.

Fingas, M., Laroche, N. N., Sergy, G., Mansfield, B., Cloutier, G., & Mazerolle, P. (1991). A New Chemical Spill Priority List, Proceedings of the Eight Technical Seminar on Chemical Spills. *Environment Canada*, 223-232.

García-Reyes, J. F., Ferrer, C., Gómez-Ramos, M. J., Fernández-Alba, A. R., & Molina-Díaz, A. (2007a). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 239-251.

García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., Ferrer, M. C., Gómez-Ramos, J., & Fernández-Alba, A. (2007b). Metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en aceite de oliva y aceituna. *Cromatografía y técnicas afines*, 28(2), 39-59.

García Sánchez, A., Ramos Martos, N., & Ballesteros, E. (2006). Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography—tandem mass-spectrometric determination. *Analytica Chimica Acta*, 558(1-2), 53-61.

Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., Pastor-Montoro, E., & Romero-González, R. (2008). High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(3), 947-959.

Garrido Frenich, A., Romero-González, R., & Aguilera-Luiz, M. M. (2014). Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 63, 158-169.

---

- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A.H., Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 1291-1340.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Fernández-Alba, A. R., & Molina-Díaz, A. (2010a). 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(24), 3736-3747.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Lozano, A., Fernández-Alba, A. R., & Molina-Díaz, A. (2010b). 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(39), 6022-35.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*, 79(2), 109-128.
- Gilbert-López, B., Robles-Molina, J., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2010c). Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). *Talanta*, 83(2), 391-399.
- Giugliano, D., & Esposito, K. (2008). Mediterranean diet and metabolic diseases. *Current Opinion Lipidol*, 19(1), 63-68.
- González-Curbelo, M., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169-185.
- Grant, J., Rodgers, C. A., Chickering, C. D., Hill, S. J., & Stry, J. J. (2010). Determination of chlorantraniliprole residues in crops by liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal AOAC International*, 93, 1293-1301.
- Gros, J. H. (2004). *Mass spectrometry* (1st Ed.). Heidelberg (Alemania): Springer-Verlag.
- Han, Y., Huang, B., Liu, S., Zou, N., Yang, J., Zhong, Z., Zou, N., Song, L., Zhang, X., Li, X., & Pan, C. (2016). Residue levels of five grain-storage-use insecticides during the production process of sorghum distilled spirits. *Food Chemistry*, 206, 12-17.

- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R., & López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, *307*, 136-145.
- Hernández, F., Pozo, O. J., Sancho, J. V., Bijlsma, L., Barreda, M., & Pitarch, E. (2006). Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *Journal of Chromatography A*, *1109*(2), 242-252.
- Hoffmann, E. & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry* (3rd Ed.). Chichester (Reino Unido): John Wiley & Sons, Ltd.
- Howard, B. V., Horn, V., Hsia, J., Manson, J. E., Stefanick, M. L., Wassertheil-Smoller, S., Kuller, L. H., LaCroix, A. Z., Langer, R. D., Lasser, N. L., Lewis, C. E., Limacher, M. C., Margolis, K. L., Mysiw, W. J., Ockene, J. K., Parker, L. M., Perri, M. G., Phillips, L., Prentice, R. L., Robbins, J., Rossouw, J. E., Sarto, G. E., Schatz, I. J., Snetselaar, L. G., Stevens, V. J., Tinker, L. F., Trevisan, M., Vitolins, M. Z., Anderson, G. L., Assaf, A. R., Bassford, T., Beresford, S. A. A., Black, H. R., Brunner, R. L., Brzyski, R. G., Caan, B., Chlebowski, R. T., Gass, M., Granek, I., Greenland, P., Hays, J., Heber, D., Heiss, G., Hendrix, S. L., Hubbell, F. A., Johnson, K. C., & Kotchen, J. M. (2014). Low-Fat Dietary Pattern and Risk of Cardiovascular Disease. *Journal of American Medical Association*, *295*(6), 655-666.
- Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, *880*, 35-62.
- Keikotlhaile, B. M., Spanoghe, P., & Steurbaut, W. (2010). Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.031>
- Kiritsakis, A. & Christie, W. W. (2003). Análisis de aceites comestibles. En *Manual del aceite de oliva* (1ª Ed.). Madrid (España): Ediciones Mundi-Prensa.
- Krieger, R. I., & Kireger, W. C. (2001). *Handbook of pesticide toxicology* (2nd Ed.). Cambridge (United States): American Press.
- La Cal Herrera, J. A. (2013). *Viabilidad de la integración de una planta de gasificación de biomasa*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén.
- La Vecchia, C. (2004). Mediterranean diet and cancer. *Public Health Nutrition*, *7*(7), 965-968.
-

- Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., & Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, *1217*(16), 2548-2560.
- Li, L., Xu, Y., Pan, C., Zhou, Z., Jiang, S., & Liu, F. (2007). Simplified pesticide multiresidue analysis of soybean oil by low-temperature cleanup and dispersive solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. *Journal AOAC International*, *90*, 1387-1393.
- Li, M., Liu, Y., Fan, B., Lu, J., He, Y., Kong, Z., Zhu, Y., Jian, Q., & Wang, F. (2015). A chemometric processing-factor-based approach to the determination of the fates of five pesticides during apple processing. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(2), 1102-1109.
- Li, Y., Jiao, B., Zhao, Q., Wang, C., Gong, Y., Zhang, Y., & Chen, W. (2012). Effect of commercial processing on pesticide residues in orange products. *European Food Research and Technology*, *234*(3), 449-456.
- List of list. (2012). Consolidated list of chemical subject to the emergency planning and community right-to-know act (EPCRA), comprehensive environmental response, Compensation and liability act (CERCLA) and section 112 (r) of the clean air act. *U.S. Environmental Protection Agency*.
- Liu, N., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Li, Y., Han, Y., Zhu, Y., Cheng, Y., Chen, Z., Tao, Y., & Zheng, Y. (2014). Effect of household canning on the distribution and reduction of thiophanate-methyl and its metabolite carbendazim residues in tomato. *Food Control*, *43*, 115-120.
- Lopes, T. J., & Bender, D. A. (1998). Nonpoint sources of volatile organic compounds in urban areas-relative importance of land surfaces and air. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, *101*(2), 221-30.
- López-Blanco, R., Nortes-Méndez, R., Robles-Molina, J., Moreno-González, D., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F. & Molina-Díaz, A. (2016a). Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1456*, 89-104.
- López-Blanco, R., Gilbert-López, B., Rojas-Jiménez, R., Robles-Molina, J., Ramos-Martos, N., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2016b). Evaluation of processing factors for selected organic contaminants during virgin olive oil production: Distribution of BTEXS during olives processing. *Food Chemistry*, *199*, 273-279.

- López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M. I., Estrich, E., Ordovás, J. M., Sorigue, F., Abiá, R., Alarcón de la Lastra, C., Battino, M., Corella, D., Chamorro-Quirós, J., Delgado-Lista, J., Giugliano, D., Esposito, K., Estruch, R., Fernández-Real, J. M., Gaforio, J. J., La Vecchia, C., Lairon, D., López-Segura, F., Mata, P., Menéndez, J. A., Muriana, F. J., Osada, J., Panagiotakos, D. B., Paniagua, J. A., Pérez-Martínez, P., Perona, J., Peinado, M. A., Pineda-Priego, M., Poulsen, H. E., Quiles, J. L., Ramírez-Tortosa, M. C., Ruano, J., Serra-Majem, L., Solá, R., Solanas, M., Solfrizzi, V., de la Torr-Fornell, R., Trichopoulou, A., Uceda, M., Villalba-Montoro, J. M., Villar-Ortiz, J. R., Visioli, F., & Yiannakouris, N. (2010). Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(4), 284-294.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Composición del aceite de oliva. En *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*. Málaga (España): Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja.
- Lozano, A., Rajski, Ł., Uclés, S., Belmonte-Valles, N., Mezcua, M., & Fernández-Alba, A. R. (2014). Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 118, 68-83.
- Lu, W., Peng, X. T., Shen, J., Hu, X. Z., Peng, L. J., & Feng, Y. Q. (2015). Development and validation of a modified QuEChERS method based on magnetic zirconium dioxide microspheres for the determination of 52 pesticides in oil crops by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7(20), 8663-8672.
- Malik, A. K., Blasco, C., & Picó, Y. (2010). Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4018-4040.
- Martin, L., Mezcua, M., Ferrer, C., Gil García, M. D., Malato, O., & Fernández-Alba, A. (2013). Prediction of the processing factor for pesticides in apple juice by principal component analysis and multiple linear regression. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(3), 466-476.
- Martínez-González, M. A., de la Fuente-Arrillaga, C., Nuñez-Córdoba, J. M., Basterra-Gortari, F. J., Beunza, J. J., Vázquez, Z., Benito, S., Tortosa, A., & Bes-Rastrollo, M. (2008). Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 336(7657), 1348-51.
-

- Masiá, A., Blasco, C., & Picó, Y. (2014). Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2, 11-24.
- Mataix-Verdú, F. J. (2001). *Aceite de Oliva Virgen: Nuestro patrimonio alimentario (Informe)*. Instituto omega 3 (Fundación Puleva). Granada (España): Universidad de Granada.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019-3030.
- Menendez, J. A., Papadimitropoulou, A., Vellon, L., & Lupu, R. (2006). A genomic explanation connecting «Mediterranean diet», olive oil and cancer: Oleic acid, the main monounsaturated Fatty acid of olive oil, induces formation of inhibitory «PEA3 transcription factor-PEA3 DNA binding site» complexes at the Her-2/neu (erbB-2) oncogene promoter in breast, ovarian and stomach cancer cells. *European Journal of Cancer*, 42(15), 2425-2432.
- Meniconi, M. D. F. G., Gabardo, I. T., Carneiro, M. E. R., Barbanti, S. M., da Silva, G. C., & Massone, C. G. (2002). Brazilian Oil Spills Chemical Characterization—Case Studies. *Environmental Forensics*, 3, 303-321.
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (1988). *Statistics for analytical chemistry* (2nd Ed.). London (United Kingdom): Ellis Horwood.
- Moreno-González, D., Huertas-Pérez, J. F., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2014). Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. *Talanta*, 128, 299-304.
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157-177.
- Mozaffarian, D., Marfisi, R., Levantesi, G., Silletta, M. G., Tavazzi, L., Tognoni, G., Valagussa, F., & Marchioli, R. (2007). Incidence of new-onset diabetes and impaired fasting glucose in patients with recent myocardial infarction and the effect of clinical and lifestyle risk factors. *Lancet*, 370(9588), 667-675.

- Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Portolés, T., Berntssen, M. H. G., Pérez-Sánchez, J., & Hernández, F. (2014). Screening of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds and fish tissues by gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(10), 2165-2174.
- Nguyen, T. D., Lee, M. H., & Lee, G. H. (2010). Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal*, *95*(1), 113-119.
- Nieto-García, A. J., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2015). Multi-pesticide residue analysis in nutraceuticals from grape seed extracts by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Control*, *47*, 369-380.
- Nováková, L., Havlíková, L., & Vlčková, H. (2014). Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *63*, 55-64.
- Oláh, E., Fekete, S., Fekete, J., & Ganzler, K. (2010). Comparative study of new shell-type, sub-2 micron fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance. *Journal of Chromatography A*, *1217*(23), 3642-3653.
- Olías-Jiménez, J.M., Gutiérrez-Rosales, L.F., Dobarganes-García, M.C., & Gutiérrez González-Quijano, R. (1980). Componentes volátiles en el aroma del aceite de oliva. VI. Su evolución e influencia en el aroma durante el proceso de maduración de los frutos en las variedades picual y hojiblanca. *Grasas y Aceites*, *6*, 391-401.
- Olliver, D., & Guérère, M. (2001). Development of a benzene hydrocarbon measurement method for virgin olive oils. *American Laboratory*, *33*(11), 18-20.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*, *1*(2), 107-112.
- Papadakis, E. N., Tsaoulas, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015). Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, *536*, 793-802.
-

- 
- Patel, K., Fussell, R. J., Hetmanski, M., Goodall, D. M., & Keely, B. J. (2005). Evaluation of gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. *Journal of Chromatography A*, *1068*(2), 289-296.
- Peña, F., Cárdenas, S., Gallego, M., & Valcárcel, M. (2004). Direct screening of olive oil samples for residual benzene hydrocarbon compounds by headspace-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *526*(1), 77-82.
- Polgár, L., Kmellár, B., García-Reyes, J. F., & Fodor, P. (2012). Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS. *Analytical Methods*, *4*(4), 1142-1148.
- Poole, S., & Blades, M. (2013). The Mediterranean diet – a review of evidence relevant to the food and drink industry. *Nutrition & Food Science*, *43*(1), 7-16.
- Preedy, V. R., & Watson, R. R. (2010). *Olives and olive oil in health and disease prevention*. Elsevier.
- Quirantes, R., Domínguez Corona, J. J., Segura Carretero, A., & Fernández Gutiérrez, A. (2009). Técnicas de análisis del aceite de oliva. En *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*. Málaga (España): Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja.
- Rajski, Ł., Lozano, A., Uclés, A., Ferrer, C., & Fernández-Alba, A. R. (2013). Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1304*, 109-20.
- Ramezani, M. K., & Shahriari, D. (2015). Dissipation behaviour, processing factors and risk assessment for metalaxyl in greenhouse-grown cucumber. *Pest Management Science*, *71*(4), 579-583.
- Rasche, C., Fournes, B., Dirks, U., & Speer, K. (2015). Multi-residue pesticide analysis (gas chromatography-tandem massspectrometry detection)—Improvement of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for dried fruits and fat-richcereals—Benefit and limit of a standardized apple purée calibra. *Journal of Chromatography A*, *1403*, 21-31.
- Real Decreto 140/2003. (2003). Por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *Boletín Oficial del Estado*, *45*, 7228-7245.
-

- Real Decreto 290/2003. (2003). Por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal. *Boletín Oficial del Estado*, 58, 9299-9308.
- Reglamento (CE) 149/2008. (2008). Por el que se modifica el Reglamento (CE) 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*, L58, 1-398.
- Reglamento (CE) 396/2005. (2005). Relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L70, 1-49.
- Reglamento (UE) 1348/2013. (2013). Relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 31-67.
- Reglamento (UE) 2015/595. (2015). Relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2016, 2017 y 2018 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en y sobre los alimentos de origen vegetal y animal y a evaluar el grado de expo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L99/7.
- Reglamento (UE) 2016/662. (2016). Relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2017, 2018 y 2019 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en y sobre los alimentos de origen vegetal y animal y a evaluar el grado de expo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L115/2.
- Reglamento (UE) 29/2012. (2012). Sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L12, 14-21.
- Reglamento (UE) 400/2014. (2014). Relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2015, 2016 y 2017 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal y a evaluar el grado de exposición d. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L119, 44-56.
- Riccardi, G., Giacco, R., & Rivellese, A. A. (2004). Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*, 23(4), 447-456.
-

- Roman, B., Carta, L., Martínez-González, M. Á., & Serra-Majem, L. (2008). Effectiveness of the Mediterranean diet in the elderly. *Clinical Interventions in Aging*, 3(1), 97-109.
- Ruiz-Canela, M., & Martínez-González, M. Á. (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, 68(3), 245-250.
- Ruiz Méndez, M. V., Pérez de la Rosa, I., Jiménez Márquez, A., & Uceda Ojeda, M. (2005). Elimination of pesticides in olive oil by refining using bleaching and deodorization. *Food Additives and Contaminants*, 22(1), 23-30.
- Salas Liñan, J. J. (1998). *Ruta de la lipoxigenasa en aceituna: contribución a la biogénesis del aroma del aceite de oliva*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Saleh, M. (2014). *Tratamiento a presión e hidrólisis del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con pachysolen tannophilus*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén.
- SANTE/11945/2015. (2016). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. *European Commission*.
- Shabeer, T. P. A., Banerjee, K., Jadhav, M., Girame, R., Utture, S., Hingmire, S., & Oulkar, D. (2015). Residue dissipation and processing factor for dimethomorph, famoxadone and cymoxanil during raisin preparation. *Food Chemistry*, 170, 180-185.
- Skoog, D. A. & Leary, J. J. (1994). *Análisis instrumental* (4ª Ed.). Madrid (España): Editorial McGraw-Hill.
- Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Rizzo, C., Capurso, A., & Panza, F. (2006). Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: A 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiology of Aging*, 27(11), 1694-1704.
- Solfrizzi, V., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Capurso, C., Del Parigi, A., Capurso, S., Gadaleta, A., Capurso, A., & Panza, F. (2005). Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia. *Experimental Gerontology*, 40(4), 257-270.
- Supelco, (2016). Analysis of compounds in fatty matrices. Recuperado a partir de:  
[http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/1/12023\\_T414114\\_Compounds\\_in\\_Fatty\\_Mat](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/1/12023_T414114_Compounds_in_Fatty_Mat)

rices.pdf

- Toledo, C., Enríquez, P., Garrido, M., Fernández-Band, B., & Richter, P. (2010). Headspace-mass spectrometry with alternative chromatographic separation using a column switching system for the screening and determination of BTEX and styrene in comestible oil. *Analytical Letters*, *43*(5), 843-850.
- Trichopoulou, A., & Dilis, V. (2007). Olive oil and longevity. *Molecular Nutrition and Food Research*, *51*(10), 1275-1278.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., & Trichopoulos, D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, *9*(9), 869-873.
- Uceda, M., Aguilera, M. P., Jiménez, A., & Beltrán, G. (2009). Variedades de olivo y aceituna. Tipos de aceites. En *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*. Málaga (España): Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja.
- Van Nuijs, A. L. N., Tarcomnicu, I., & Covaci, A. (2011). Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *Journal of Chromatography A*, *1218*(35), 5964-5974.
- Vass, A., Robles-Molina, J., Pérez-Ortega, P., Gilbert-López, B., Dernovics, M., Molina-Díaz, A., & García-Reyes, J. F. (2016). Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(18), 4857-4869.
- Vera Candeas, D. (2013). *Generación eléctrica distribuida y aprovechamiento de los residuos de la industria del olivar*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1090*(1-2), 146-154.
- Vilar-Hernández, J., Cárdenas-García, J. R., & Estévez-Alcalde, A. (2012). *El sector internacional de elaboración de aceite de oliva: un estudio descriptivo de los distintos países productores*. (GEA-Centro Internacional de Excelencia para Aceite de Oliva, Ed.). Andújar (Jaén): Gráficas Francisco del Moral S.A.
-

- 
- Wang, Z., Li, K., Fingas, M., Sigouin, L., & Ménard, L. (2002). Characterization and source identification of hydrocarbons in water samples using multiple analytical techniques. *Journal of Chromatography A*, 971(1-2), 173-184.
- Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), 803-812.
- Zhan, J., Li, J., Liu, D., Liu, C., Yang, G., Zhou, Z., & Wang, P. (2016). A simple method for the determination of organochlorine pollutants and the enantiomers in oil seeds based on matrix solid-phase dispersion. *Food Chemistry*, 194, 319-324.
- Zhao, L., Ge, J., Liu, F., & Jiang, N. (2014). Effects of storage and processing on residue levels of chlorpyrifos in soybeans. *Food Chemistry*, 150, 182-186.
- Zougagh, M., Bouabdallah, M., Salghi, R., Hormatallah, A., & Rios, A. (2008). Supercritical fluid extraction as an on-line clean-up technique for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatography for confirmation of paraquat and diquat in olive oil samples. *Journal of Chromatography A*, 1204(1), 56-61.
- Zunin, P., Boggia, R., Lanteri, S., Leardi, R., De Andreis, R., & Evangelisti, F. (2004). Direct thermal extraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of volatile compounds of extra-virgin olive oils. *Journal of Chromatography A*, 1023(2), 271-276.
-



---

# Anexos

---



## VI. ANEXOS

### A) CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

#### Publicaciones en revistas científicas

**Título:** "Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry".

**Revista:** Journal Chromatography A

**Año:** 2016

**Volumen:** 1456

**Páginas:** 89-104

**Autores:** López-Blanco, Rafael; Nortes-Méndez, Rocío; Robles-Molina, José; Moreno-González, David; Gilbert-López, Bienvenida; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

**Factor de Impacto:** 3.926

**Cuartil:** Q1-11/75; Química Analítica

**Título:** "Evaluation of processing factors for selected organic contaminants during virgin olive oil production: Distribution of BTEXS during olives processing".

**Revista:** Food Chemistry

**Año:** 2016

**Volumen:** 199

**Páginas:** 273-279

**Autores:** López-Blanco, Rafael; Gilbert-López, Bienvenida; Robles-Molina, José; Ramos-Martos, Natividad; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

**Factor de Impacto:** 3.391

**Cuartil:** Q1-7/125; Ciencia y tecnología de los alimentos

**Título:** "Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry".

**Revista:** Talanta

**Año:** 2016

**Volumen:** 158

**Páginas:** 222-228

**Autores:** Nortes-Méndez, Rocío; Robles-Molina, José; López-Blanco, Rafael; Vass, Andrea; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

**Factor de Impacto:** 4.035

**Cuartil:** Q1-9/75; Química Analítica

## Comunicaciones científicas presentadas a congresos

Los resultados obtenidos en esta tesis han sido diseminados a través de un total de 9 comunicaciones presentadas a congresos, comprendidas por: 2 comunicaciones de tipo oral y 7 presentaciones en formato póster. Éstas han sido presentadas en reuniones tanto de carácter nacional (SECyTA, J2IFAM y GRASEQA), como internacional (ANQUE-ICCE-BIOTECH y EXPOLIVA). Dichas comunicaciones se detallan a continuación:

**Título de la aportación:** "Desarrollo de un método de extracción de plaguicidas con EMR-Lipid en matrices de alto contenido graso y estudio de su transferencia de la aceituna al aceite de oliva virgen extra mediante GC-IT".

**Nombre del Congreso:** IX Jornadas de Jóvenes Investigadores en Física Atómica y Molecular (J2IFAM).

**Tipo de evento:** Comunicación Oral

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2017

**Lugar:** Sevilla

**Autores:** López-Blanco, Rafael; Moreno-González, D.; Nortes-Méndez, Rocío; Robles-Molina, José; Gilbert-López, Bienvenida; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio.

---

**Título de la aportación:** "Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry".

**Nombre del Congreso:** XV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica.

**Tipo de evento:** Comunicación en formato Póster

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2016

**Lugar:** Almería

**Autores:** López-Blanco, Rafael; Nortes-Méndez, Rocío; Robles-Molina, José; Moreno-González, David; Gilbert-López, Bienvenida; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio.

**Título de la aportación:** "Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry.

**Nombre del Congreso:** XV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

**Tipo de evento:** Comunicación en formato Póster

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2016

**Lugar:** Almería

**Autores:** Nortes-Méndez, Rocío; Robles-Molina, José; López-Blanco, Rafael; Vass, Andrea; Molina-Díaz, Antonio; García-Reyes, Juan Francisco

**Título de la aportación:** "Multiresidue determination of pesticides in olive oil by UHPLC-MS/MS and acetonitrile partitioning with different clean-up steps using zirconium dioxide-based sorbents" (II).

**Nombre del Congreso:** Jornadas Doctorales para Jóvenes Investigadores de la Universidad de Jaén

**Tipo de evento:** Comunicación en formato Póster y presentación Flash

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2015

**Lugar:** Jaén

**Autores:** López-Blanco, Rafael

**Título de la aportación:** “Multiresidue determination of pesticides in olive oil by UHPLC-MS/MS and acetonitrile partitioning with different clean-up steps using zirconium dioxide-based sorbents” (1).

**Nombre del Congreso:** XV Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines

**Tipo de evento:** Comunicación en formato Póster

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2015

**Lugar:** Castellón de la Plana

**Autores:** López-Blanco, Rafael, Nortes, Rocío; Robles-Molina, José; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

**Título de la aportación:** “Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry”.

**Nombre del Congreso:** XV Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines

**Tipo de evento:** Comunicación en formato Póster

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2015

**Lugar:** Castellón de la Plana

**Autores:** Nortes, Rocío; López-Blanco, Rafael; Robles-Molina, José; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

**Título de la aportación:** “Estudio del comportamiento de los hidrocarburos aromáticos monocíclicos –BTEXS- durante la producción del aceite de oliva virgen”.

**Nombre del Congreso:** XVII Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA

**Tipo de evento:** Comunicación en formato Póster

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2015

**Lugar:** Jaén

**Autores:** López-Blanco, Rafael; Gilbert-López, Bienvenida; Robles-Molina, José; Ramos-Martos, Natividad; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

---

---

**Título de la aportación:** “Estudio de contaminación de aceitunas por BTEXS, evaluando diferentes focos de emisión y su determinación mediante espectrometría de masas”.

**Nombre del Congreso:** VII Jornadas de Jóvenes Investigadores en Física Atómica y Molecular (J2IFAM)

**Tipo de evento:** Comunicación Oral

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2015

**Lugar:** Jaén

**Autores:** López-Blanco, Rafael; Gilbert-López, Bienvenida; Robles-Molina, José; Ramos-Martos, Natividad; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

**Título de la aportación:** “Behaviour and transference study of BTEXS from spiked olives to olive oil during production stage”.

**Nombre del Congreso:** ANQUE-ICCE-BIOTECH, Congresses on Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology

**Tipo de evento:** Comunicación en formato Póster

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2014

**Lugar:** Madrid

**Autores:** López-Blanco, Rafael; Rojas-Jiménez, Rubén; Robles-Molina, José; Gilbert-López, Bienvenida; Ramos-Martos, Natividad; García-Reyes, Juan Francisco; Molina-Díaz, Antonio

---



## B) ACRÓNIMOS

Para la mayoría de los acrónimos se emplea la abreviatura o acrónimo anglosajón debido a su empleo más generalizado.

- APCI**  
Atmospheric pressure chemical ionization..... 79, 80
- ARfD**  
Dosis aguda de referencia..... 71
- ATR-FTIR**  
Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy .... 115
- ATSDR**  
Agency for toxic substances and disease registry..... 68, 69
- BPA**  
Buenas prácticas agrícolas ..... 71, 72
- BTEXS**  
Benzene, toluene, ethylbenzene, (m-, p-, o-) xylene and styrene.....21, 22, 23, 27, 28, 29, 33, 34, 68, 74, 92, 93, 95, 159, 161, 163, 164, 165, 167, 168, 169, 171, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 215, 239, 242, 243
- CID**  
Collision induced dissociation.....83, 86, 110, 201
- COI**  
Consejo oleícola internacional.....40, 41, 42, 43, 44, 54
- DDT**  
Diclorodifeniltricoloetano ..... 66
- DHHS**  
Department of health and human services ..... 69
- DOP**  
Denominación de origen protegida .....48
- dSPE**  
Dispersive solid phase extraction .....22, 75, 76, 90, 101, 102, 105, 109, 114, 138, 146
- EFC**  
Electronic flow control..... 166
- EI**  
Electron impact.....81
- EIC**  
Extracted ion chromatogram ..... 155
- EMR-Lipid**  
Enhanced matrix removal-lipid.. .....7, 22, 28, 76, 90, 102, 103, 105, 106, 109, 115, 118, 122, 124, 125, 126, 127, 131, 133, 134, 138, 139, 142, 187, 188, 201, 215, 240
- EPA**  
Environmental protection agency..... 73
- ESI**  
Electrospray ionization .....79, 80, 81
- FAO**  
Food and agriculture organization.....27, 64, 68, 71, 73, 104
- FEDNA**  
Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal..... 50
- FS**  
Full scan .....113
- GCB**  
Graphitized carbon black.....75, 90, 101
- GC-MS/MS**  
Gas chromatography tandem mass spectrometry.....21, 23, 27, 29, 33, 63, 90, 104, 105, 184, 185, 187, 188, 189, 202, 208, 215
- GPC**  
Gel permeation chromatography ...74, 75, 89, 101, 146
- HESI**  
Heated electrospray ionization.....110, 150, 156, 201
- HILIC-MS/MS**  
Hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry.....22, 23, 24, 28, 29, 143, 145, 149, 184, 185, 201, 202
- HILIC-TOFMS**  
Hydrophilic interaction liquid chromatography time of flight mass spectrometry.....22, 28, 143, 151, 153, 155
- HLB**  
Hydrophilic lipophilic balance ..... 76
- HRMS**  
High resolution mass spectrometry .... 82, 89
- HS-GC-MS**  
Head space gas chromatography mass spectrometry .....23, 29, 95, 166, 167, 168, 182

- ICP-MS**  
Inductively coupled plasma mass spectrometry.....63, 115
- ICR**  
Ion cyclotron resonance ..... 82
- IDA**  
Ingesta diaria admisible ..... 71, 72
- IT**  
Ion trap ..... 84, 89, 210, 240
- LIT**  
Linear ion trap..... 82
- LLE**  
Liquid-liquid extraction..... 101
- LOQ**  
Limit of quantitation ..... 138, 157, 158
- MAH**  
Monocyclic aromatic hydrocarbon..... 68, 161
- MIP**  
Molecularly imprinted polymer ..... 76
- MRL**  
Maximum residue limit.....24, 33, 71, 73, 104, 138, 184, 186, 195, 196, 200, 216
- MRM**  
Multiple reaction monitoring...22, 28, 86, 87, 89, 110, 113, 143, 150, 156, 202
- MSPD**  
Matrix solid phase dispersion.....89, 101
- MUFA**  
Monounsaturated fatty acid ..... 52
- NIST**  
National institute of standards and technology ..... 81
- NOEL**  
No observed effect level ..... 71, 72
- OMS**  
Organización mundial de la salud 64, 68, 73, 104
- PF**  
Processing factor 176, 177, 186, 187, 189, 190, 191, 194, 195, 196, 200
- PFTBA**  
Perfluorotributylamine..... 166
- PIBA**  
Producto interior bruto agrícola ..... 37
- PIS**  
Product ion scan..... 86
- PSA**  
Primary secondary amin.....22, 28, 90, 101, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 115, 118, 122, 124, 126, 127, 131, 133, 134, 142
- PTFE**  
Polytetrafluoroethylene..... 109, 165, 167
- PTV**  
Programmable temperature vaporization ..... 166
- PUFA**  
Polyunsaturated fatty acid ..... 52
- QqQ**  
Triple quadrupole mass spectrometer 83, 84, 86, 89, 102, 110, 150, 152, 166, 201
- QuEChERS**  
Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe.....22, 28, 75, 89, 102, 103, 105, 108, 109, 142, 146, 188, 189, 215
- QuPPE**  
Quick method for polar pesticides..... 22, 28, 143, 147, 149, 188, 189, 201
- RP-LC**  
Reverse phase liquid chromatography ..... 204, 205, 206, 207
- RRHD**  
Rapid resolution high definition .....110, 149, 202
- RSD**  
Relative standard deviation.....103, 110, 118, 124, 125, 127, 131, 132, 134, 142, 157, 158, 167, 176, 177, 191, 210
- RSLC**  
Rapid separation liquid chromatography ..... 110
- S/N**  
Signal noise relation.....89, 138
- SIM**  
Selected ion monitoring .....85, 86, 88, 89, 166, 167
- SPE**  
Solid phase extraction.....74, 75, 89, 101, 104, 105, 109, 146, 148, 154
- SPME**  
Solid phase micro extraction .....76, 89, 93, 95, 101, 164
- TFA**  
Trifluoroacetic acid .....150
- TIC**  
Total ion chromatogram ..... 114, 153
- TOF**  
Time of flight.....85, 89, 114, 149, 150, 157, 158
- UE**  
Unión Europea .....71, 73
- UHPLC-MS/MS**  
Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.....21, 23, 27, 28, 33, 103, 105, 111, 113, 138, 142, 151, 155, 157, 158, 184, 189, 215, 241, 242

## C) ÍNDICE DE TABLAS

### II.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Tabla II.1: Características más importantes de las especies varietales de olivar .....	39
Tabla II.2: Subproductos derivados de la olivicultura y la elaiotecnia .....	45
Tabla II.3: Porcentaje de ácidos grasos en los aceites vegetales más importantes .....	50
Tabla II.4: Principales ácidos grasos presentes en la naturaleza .....	52
Tabla II.5: Técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de aceites de oliva .....	63
Tabla II.6: Principales tipos de plaguicidas utilizados en la agricultura .....	64
Tabla II.7: Modos de trabajo MS-MS en función de las configuraciones de trabajo de los distintos cuadrupolos .....	86
Tabla II. 8: Requisitos de la guía SANTE para la identificación de analitos .....	89

### III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table III.1: Classification of the pesticides studied according to active substances, Log Kow values and their use in olives groves.....	106
Table III.2: UHPLC-MS/MS parameters for the determination of the studied pesticides.....	111
Table III.3: Recovery rates (RR), RSD (n=6) and matrix effects (ME) for each sorbent in olive oil .....	118
Table III.4: Recovery rates (RR), RSD ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and matrix effects (ME) in the determination of pesticides in olive oil samples employing different sorbents from previous literature .....	124
Table III.5: Recovery rates (RR), RSD (n=6) and matrix effects (ME) for each sorbent in olives. ....	127

Table III.6: Recovery rates (RR), RSD (n=6) and matrix effects for each sorbent in avocado .....	134
Table III.7: Analytical performance of the UHPLC-MS/MS method using EMR-Lipid in the three matrices, with the current EU MRL levels. ....	140
Table III.8: Chemical information of target pesticides.....	148
Table III.9: Identification parameters of polar pesticides by accurate mass measurements using UHPLC-TOFMS analysis.....	155
Table III.10: Optimized MRM parameters for target compounds for their analysis by UHPLC(HILIC)-MS/MS .....	156
Table III.11: Recovery values and RSD (%) for target pesticides obtained for the analysis in olive oil and olive matrices by UHPLC-MS/MS.....	157
Table III.12: Analytical parameters by UHPLC(HILIC)-MS/MS and comparison of LOQs with UHPLC(HILIC)-TOFMS analysis method.....	158
Table III.13: Analytical figures of merit for the determination of BTEXS in olives using HS-GC-MS. For details see: Gilbert-López et al., 2010c.....	167
Table III.14: Analytical figures of merit for the determination of BTEXS in olive oil using HS-GC-MS. For details see: Gilbert-López et al., 2010c. ....	167
Table III.15: Detailed information about BTEXS concentrations found in different samples of Andalusia ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).....	169
Table III.16: Features of each sample analyzed within the olive grove.....	173
Table III.17: Main physicochemical properties of BTEXS .....	175
Table III.18: Concentration of BTEXS in gasoil and gasoline.....	175
Table III.19: Olives mass spiked ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), oil mass extracted and efficiencies obtained. ....	176
Table III.20: BTEXS concentration in olives and their corresponding virgin olive oil samples. Study of processing factor .....	177

---

Table III.21: BTEXS concentrations obtained from the analyses of olives from trees closer the road (contamination source) and from the inner of the olive plot.....179

Table III.22: Detailed values of statistical study by BTEXS concentration obtained from different locations.....181

Table III.23: Calculation of experimental processing factors (PF (%)) n=6, calculated PF (%) using the log Kow overall model, and the PF using the class specific regression equation....191

Table III.24: PFs (%) and MRLs obtained for each pesticide in olive oil according to the conversion factor of 5 with the proposed equation or the individual experimental PFs calculated.....196

#### III.4.5.- Supplementary data

Table SD.1: Features of all compounds studied and analytical technique employed .....204

Table SD.2: Analytical parameters of method development for GC-MS/MS analysis.....208

Table SD.3: Recovery rates (RR) and relative standard deviation obtained in the preliminary analysis by GC-IT (n=6).....210

---

## D) ÍNDICE DE FIGURAS

### II.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Figura II.1: Mapamundi con los principales países productores de aceite de oliva .....	37
Figura II.2: Datos de producción de aceituna, campaña 2015-2016 .....	38
Figura II.3: Esquema de los distintos tipos de aceites de oliva que se comercializan .....	44
Figura II.4: Proceso completo de extracción del aceite de oliva en la almazara .....	46
Figura II.5: Decánter horizontal de un sistema continuo de extracción de 3 fases. ....	48
Figura II.6: Sistema Abencor para la extracción de aceite de oliva .....	49
Figura II.7: Esquema de los componentes del aceite de oliva .....	51
Figura II.8: Composición de ácidos grasos de distintas grasas y aceites consumidos.....	54
Figura II.9: Reacción de formación de los triglicéridos .....	55
Figura II.10: Estructura del escualeno ( $C_{30}H_{50}$ ) .....	56
Figura II.11: Estructura del $\beta$ -Caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ).....	57
Figura II.12: Estructura del $\alpha$ -Tocoferol ( $C_{29}H_{50}O_2$ ) .....	57
Figura II.13: Estructuras químicas de sus isómeros estructurales ( $C_{30}H_{50}O_2$ ) .....	58
Figura II.14: Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno ( $C_{17}H_{28}$ ).....	59
Figura II.15: Estructuras de los pigmentos clorofílicos y sus derivadas feofitinas.....	59
Figura II.16: (a) Estructura química general de la familia de los organofosforados; (b) estructura del Malathion ( $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ ) .....	66
Figura II.17: Estructura química del $\alpha$ -Endosulfan ( $C_9H_6Cl_6O_3S$ ).....	66

---

Figura II.18: (a) Estructura química general de los carbamatos; (b) estructura del Carbaryl (C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> ).....	66
Figura II.19: (a) Estructura de la nicotina (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> ); (b) Imidacloprid (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ) .....	67
Figura II.20: (a) Estructura química general de las triazinas (1,3,5-triazine); (b) estructura de la atrazine (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub> ) .....	67
Figura II.21: (a) Estructura general de un isómero del triazol, 1H-1,2,3-triazol (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> ); (b) estructura del difenoconazol (C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ).....	68
Figura II.22: Estructura química del Benceno (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ).....	69
Figura II.23: Estructura química del Tolueno (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ) .....	69
Figura II.24: Estructura química del Etilbenceno (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ).....	69
Figura II.25: Estructura química de los isómeros del Xileno (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ) .....	70
Figura II.26: Estructura química del Estireno (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ) .....	70
Figura II.27: Metodología para el tratamiento de muestra de aceite de oliva utilizando EMR-Lipid como sorbente.....	76
Figura II.28: Esquema instrumental de un espectrómetro y su acoplamiento con la cromatografía .....	77
Figura II.29: Diagrama de distintas fuentes de ionización en función de su rango óptimo de utilidad .....	79
Figura II.30: Fuente de ionización electrospray .....	80
Figura II.31: Vista del instrumental que compone un analizador de masas de triple cuadrupolo (QqQ).....	83
Figura II.32: Equipo LC-QqQ utilizado. Cromatógrafo de líquidos Dionex Ultimate 3000 acoplado a un espectrómetro TSQ-Quantiva triple cuadrupolo (Thermo Scientific).....	84

---

Figura II.33: Instrumento GC-IT. Cromatógrafo Focus GC acoplado a una trampa Polaris Q (Thermo Scientific). Recurso de los servicios técnicos de instrumentación (CICT, Universidad de Jaén).....	84
Figura II. 34: Equipo LC-TOF. Cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 acoplado a un espectrómetro de tiempo de vuelo Agilent 6220 (Agilent Technologies) .....	85
Figura II.35: Esquema del modo de trabajo barrido de iones producto (PIS).....	86
Figura II.36: Esquema del modo de trabajo de monitorización simultánea de transiciones MS/MS (MRM).....	87
Figura II.37: Esquema del modo de trabajo barrido de pérdidas neutras (Constant neutral loss) .....	87
Figura II.38: Esquema del modo de trabajo barrido de iones precursores (Precursor-Ion Scan).....	88

### III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figure III. 1: Overlapped total ion chromatograms obtained from UHPLC-TOFMS analysis in full scan mode (positive ion mode) of sample extracts obtained after clean-up with different sorbents tested: a) olive oil, b) olives and c) avocado .....	114
Figure III. 2: Graphical performance of the results obtained in olive oil: a) recovery rates; b) RSD and c) matrix effects .....	116
Figure III.3: 2D-Plot of the recovery rates/Log Kow in olive oil with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid, (b) Z-Sep+, (c) PSA+C18.....	117
Figure III.4: 2D Plot of the matrix effects of the species (expressed as calibration curves slope ratio) versus retention times for olive oil with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid; (b) Z-Sep+; (c) PSA+C18.....	123
Figure III.5: Graphical performance of the results obtained in olives: (a) recovery rates; (b) RSD and; (c) matrix effects.....	125
Figure III.6: 2D-Plot of the matrix effects of the species/retention time in olives with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid; (b) Z-Sep and; (c) PSA+C18 .....	126

---

Figure III.7: Graphical performance of the results obtained in avocado: (a) recovery rates; (b) RSD and; (c) matrix effects .....	132
Figure III.8: 2D Plot of the matrix effects of the species/retention time in avocado with the different sorbents studied: (a) EMR-Lipid; (b) Z-Sep; (c) PSA+C18 .....	133
Figure III.9: Extracted ion chromatograms of selected pesticides in olive oil extracts spiked at 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ using EMR-Lipid sorbent .....	139
Figure III.10: Chromatogram of a spiked of olive oil extract obtained using clean-up with EMR-Lipid sorbent. ....	139
Figure III.11: Extracted ion chromatograms for selected pesticides by LC-TOFMS using a reverse phase column (C18).....	151
Figure III.12: Chromatographic peaks of selected pesticides by UHPLC(HILIC)-TOFMS analysis of a matrix matched standard at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ : a) olive oil; b) olives.....	152
Figure III.13: Chromatographic peaks of qualifier transition of selected pesticides by UHPLC(HILIC)-QqQ-MS analysis of a matrix matched standard at 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for cyromazine, mepiquat, trimesium and diquat and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for amitrol, fosetyl and paraquat: a) olive oil; b) olives .....	152
Figure III.14: Overlapped TIC chromatograms of spiked samples of olive oil and olives by HILIC-TOFMS analysis.....	153
Figure III.15: Overlapped TIC chromatograms of olive extracts: A) Solvent, B) After clean-up procedure with C18 cartridges, C) After clean-up procedure with MCX cartridges and D) 1:10 dilution without clean-up. ....	154
Figure III.16: Comparison of EICs peaks (HILIC-TOFMS) of fosetyl-aluminium by dedicated negative method and positive method chosen for the rest of compounds.....	155
Figure III.17: Location of olives samples harvested throughout Andalusia region .....	171
Figure III.18: Aerial view of the olive grove, in which the olive trees closer to the secondary road (A-401) selected for the sampling are marked with red color, while the black circles refers to the trees selected to collect the olives inside the plot .....	171
Figure III.19: Plot of studied olive grove and nomenclature used for sample ID .....	172

---

Figure III.20: Absorption curves of BTEXS in olive oil under gasoline saturated atmosphere. (t: exposition time (hours)) .....	174
Figure III.21: a) Concentration ranges of BTEXS in the two groups of studied samples, far (>500 m) and close (<500 m) to a possible contamination source from different parts of Andalusia. ....	177
Figure III.22: b) Concentration ranges of BTEXS in olives samples from inner part of a plot and samples close to a road. The number of samples analyzed in each group is indicated in the parenthesis.....	178
Figure III.23: Plot of processing factors (PF) (%) obtained for each pesticide versus log Kow .....	191
Figure III.24: Class-specific plots of processing factors (PF) (%) obtained for each class versus log Kow .....	195

## E) GLOSARIO DE PLAGUICIDAS

A continuación, se muestra un glosario con todos los plaguicidas utilizados a lo largo de los distintos trabajos de investigación que engloban la presente memoria de tesis. En dicho glosario se incluyen, además de sus estructuras y fórmulas químicas, otras características para su determinación analítica, así como sus propiedades más importantes y las normativas europeas por los que están regulados.