



UNIVERSIDAD DE JAÉN

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

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE UNA NUEVA
METODOLOGÍA RÁPIDA PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN
SUPERFICIAL POR RESIDUOS DE
PESTICIDAS EN ACEITUNAS**

**PRESENTADA POR:
MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ ALMENAR**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JOSÉ ANTONIO GARCÍA MESA**

JAÉN, 29 DE ENERO DE 2016

ISBN 978-84-9159-024-8

**DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA
RÁPIDA PARA LA DETERMINACION DE LA
CONTAMINACION SUPERFICIAL POR RESIDUOS DE
PESTICIDAS EN ACEITUNAS.**

El director,

Fdo. Dr. JOSÉ ANTONIO GARCÍA MESA

**Memoria de Investigación presentada para aspirar al grado
de doctor por la Unversidad de Jaén**

Fdo. MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ ALMENAR

JAÉN, 2015

V^o B^o DEL DEPARTAMENTO

Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto **Proyecto RTA 2006-00097-00-00** financiado por el Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA): ***Desarrollo de métodos rápidos y automáticos para la detección de residuos en aceituna y aceite de oliva.***

Agradecimientos:

- Dra. Antonia Fernández Hernández, por su colaboración en la determinación de los componentes triterpénicos presentes en los extractos;
- Unidad de Espectrometría de Masas del SCAI (Servicio Central de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Córdoba, por su colaboración en los análisis realizados mediante GC-MS;
- Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Jaén, por su colaboración y, particularmente, por el suministro de las muestras de aceituna;
- Laboratorio Unaproliva de Jaén, por su colaboración en la determinación del contenido en ceras presentes en los extractos.

RESUMEN

Los pesticidas y los productos de protección de las cosechas son esenciales en la agricultura moderna. Desgraciadamente, su empleo supone un riesgo potencial en el ámbito de la Seguridad Alimentaria, ya que un mal empleo de los mismos puede poner en riesgo la salud de los consumidores así como la protección del medio ambiente.

En el ámbito de la producción de Aceites de Oliva, despierta gran interés la posibilidad de detectar dichos compuestos en las aceitunas de una forma rápida y sencilla, de forma que se evite su transferencia al aceite de oliva.

El análisis multiresiduo de los pesticidas es hoy en día un reto debido a los bajos niveles que presentan éstos en las muestras. Los estrictos límites de detección que son exigidos para su cuantificación en muestras de alimentos y medioambientales requieren el uso de tecnologías muy sensibles, selectivas, robustas y precisas, y lo que es más importante, que originen resultados de la forma más rápida y exacta posible.

En la presente Memoria se ha desarrollado un nuevo método multiresiduo de extracción de pesticidas, basado en el análisis superficial de las aceitunas por extracción líquida o ASEL. Dicho método, representa una alternativa al resto de procedimientos de extracción, siendo más rápido al incorporar menor número de etapas analíticas, con menor consumo de disolventes y sobretodo, con menor contenido en matriz, no siendo necesario por lo tanto, la incorporación de etapas de limpieza de los

extractos, disminuyendo la posibilidad de incorporar interferencias procedentes de la matriz.

Los pesticidas objeto de estudio fueron tres insecticidas, Fosmet, Dimetoato, y Clorpirifos y seis herbicidas, Amitrol, Diuron, Diflufenican, Terbutilazina y Oxifluorfen, ya que en los últimos años han sido los más detectados en los programas de control de residuos.

La cuantificación de dichos pesticidas fue llevada a cabo por UPLC-MS/MS que ofrece múltiples ventajas frente a otros métodos tradicionales de detección, sobretodo en lo que se refiere a velocidad en la determinación.

El método ASEL fue optimizado estudiando numerosas variables como el tipo de disolvente y la temperatura idónea para la extracción, la mejor relación peso de aceitunas en relación al volumen de disolvente, tiempos y velocidades de agitación o el número de extracciones necesarias para maximizar las recuperaciones de los pesticidas presentes.

También fue objeto de estudio en la presente Memoria el estudio del *Efecto Matriz* que incorporaría el extracto ASEL a la determinación de los pesticidas, estudiando la relación de pendientes obtenidas a partir de patrones de pesticidas en disolvente en matriz. Asimismo, fueron cuantificados los componentes que dicho extracto contenía procedente de la superficie de las aceitunas y que podrían interferir en la correcta determinación de los pesticidas.

En este sentido, también fue objeto de estudio la posibilidad de incorporar una etapa de purificación o *clean up* al método, evaluándose diversos procedimientos de limpieza de los extractos que son usados habitualmente en los laboratorios de análisis de residuos y comprobándose que tales procedimientos no eran necesarios para mejorar la cuantificación de los pesticidas extraídos por el nuevo procedimiento propuesto.

Además, también ha sido llevado a cabo un estudio de la posible influencia del estado de maduración de las aceitunas sobre la correcta determinación de los pesticidas. Para ello, además de los extractos procedentes del método ASEL fueron evaluados los extractos procedentes de otro método de extracción utilizado en la determinación de pesticidas en aceitunas llamado *QuEChERS* que fue usado como método de referencia durante la presente Memoria.

Asimismo, también fue objeto de estudio la posible influencia de la incorporación de una etapa de lavado previo del fruto a la extracción por el método ASEL. Para ello, fue aplicado el método ASEL a muestras de aceitunas previamente lavadas con agua. Los resultados mostraron que una etapa previa de lavado de las aceitunas no eliminaría los pesticidas adheridos a la superficie de las aceitunas.

El método ASEL fue validado en base a las recomendaciones de la guía *SANCO/12571/2013 (Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed)*,

evaluando las regresiones lineales de los pesticidas objeto de estudio en disolvente y en matriz y determinando los límites de detección, cuantificación, errores relativos, factores de respuesta, rango lineal y de trabajo, linealidad, y repetibilidad y la reproducibilidad, así como los porcentajes de recuperación a partir de muestras previamente fortificadas a concentración conocida.

Una vez validado el método ASEL, fue comparado con otros dos métodos de determinación de pesticidas en aceitunas actualmente en uso, con el objeto de conocer sus ventajas o inconvenientes, como son el método QuEChERS y un procedimiento de extracción a partir de la pasta de aceituna molida empleando un homogeneizador. Entre las características a comparar, además de la eficacia en la determinación de los analitos, se encontraría la cantidad de matriz co-extraída, el consumo de tiempo, disolventes y reactivos, la posibilidad de adaptación a diferentes sistemas de detección, así como la necesidad de incluir etapas de purificación de los extractos.

Finalmente, el método ASEL fue aplicado a la determinación de pesticidas en muestras de aceitunas de suelo y vuelo procedentes de diferentes zonas de la geografía jiennese, encontrando algunas trazas de pesticidas en muestras, aunque siempre por debajo de los LMR establecidos por la Legislación vigente.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.	1
ÍNDICE DE CONTENIDOS.	7
ÍNDICE DE TABLAS.	17
ÍNDICE DE FIGURAS.	25
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.	31
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.	37
I.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS PLAGUICIDAS: EVOLUCIÓN, CLASIFICACIÓN, APLICACIONES, LEGISLACIÓN Y MÉTODOS DE ANÁLISIS.	39
I.1.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS PLAGUICIDAS.	39
I.1.1.1. BREVE EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LOS PLAGUICIDAS.	39
I.1.1.2. LOS PLAGUICIDAS Y SU CLASIFICACIÓN.	43
I.1.2. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE PLAGUICIDAS.	53
I.1.2.1. CONSUMO DE FITOSANITARIOS A NIVEL MUNDIAL Y EUROPEO.	53
I.1.2.2. EVOLUCIÓN DEL CONSUMO DE FITOSANITARIOS A NIVEL NACIONAL.	54
I.1.3. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL Y LEGISLACIÓN.	58
I.1.3.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS PESTICIDAS Y SU MOVILIDAD EN EL MEDIO AMBIENTE.	58
I.1.3.2. EFECTO DE LOS PESTICIDAS EN EL HOMBRE.	62
I.1.3.3. LEGISLACIÓN ACTUAL SOBRE PLAGUICIDAS.	65
I.1.4. MÉTODOS DE DETERMINACION DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS.	69
I.1.4.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.	71
I.1.4.1.1. ELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN.	72
I.1.4.1.2. TIPOS DE EXTRACCIÓN.	75
I.1.4.1.2.1. EXTRACCIÓN LÍQUIDA A ALTA PRESIÓN O PLE.	75
I.1.4.1.2.2. EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS O SFE.	76
I.1.4.1.2.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS O MAE.	78
I.1.4.1.2.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR SONICACIÓN O USE.	79
I.1.4.1.2.5. OTROS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN BASADOS EN TÉCNICAS DE ADSORCIÓN.	80
I.1.4.1.2.6. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA O SPME.	85
I.1.4.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN.	87

I.1.4.3. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS.	91
I.1.4.3.1. DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS POR GC-MS.....	92
I.1.4.3.2. DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS POR LC-MS.	94
I.1.4.3.3. CROMATOGRAFÍA MULTIDIMENSIONAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS.	98
I.1.5. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS POR UPLC-MS/MS.	100
I.1.5.1. INTRODUCCIÓN AL SISTEMA UPLC.	101
I.1.5.2. INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	106
I.1.5.2.1. ANALIZADOR DE CUADRUPOLO Y ESPECTROMETRÍA DE MASA EN TANDEM.	113
I.1.5.3. ACOPLAMIENTO UPLC-MS.	116
I.2. PESTICIDAS EMPLEADOS EN EL CULTIVO DEL OLIVO: MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN.	121
I.2.1. PESTICIDAS EMPLEADOS EN EL CULTIVO DEL OLIVO.	121
I.2.1.1. CONSECUENCIA DE LA APLICACIÓN DE PLAGUICIDAS EN EL CULTIVO DEL OLIVO.	123
I.2.1.2. LMR DE LOS PLAGUICIDAS MÁS EMPLEADOS EN EL OLIVAR.	128
I.2.2. MÉTODOS ACTUALES PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITE DE OLIVA Y ACEITUNAS.....	130
I.2.2.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS Y ACEITE DE OLIVA.	130
I.2.2.1.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN ACEITUNAS Y ACEITE DE OLIVA.	131
I.2.2.1.2. MÉTODOS PURIFICACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS Y ACEITE DE OLIVA.	132
I.2.2.1.3. OTROS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS Y ACEITE DE OLIVA.	134
I.2.2.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN “QUECHERS”	135
I.2.2.2.1. GENERALIDADES SOBRE EL MÉTODO QUECHERS.....	135
I.2.2.2.2. MODIFICACIONES DEL MÉTODO QUECHERS.....	143
I.2.2.2.3. MÉTODO QUECHERS EN ACEITUNAS Y ACEITE DE OLIVA.	145
I.2.2.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN “MSPD”.	149
I.2.2.3.1. MSPD PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS.	150
I.2.2.3.2. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITE DE OLIVA POR MSPD.	151
I.2.2.4. COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN.	152

I.2.2.5. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS.....	155
I.3. PESTICIDAS OBJETO DE ESTUDIO: AMITROL, CLORPIRIFOS, DIFLUFENICAN, DIMETOATO, DIURON, FOSMET, OXYFLUORFEN Y TERBUTILAZINA.	157
I.3.1. PESTICIDAS OBJETO DE ESTUDIO.....	157
I.3.1.1. AMITROL: AMINOTRIAZOL O (3-AMINO-1, 2, 4-TRIAZOLE).	157
I.3.1.2. CLORPIRIFOS U O, O-DIETIL O-3,5,6-TRICHLOROPYRIDIN-2-IL FOSFOROTIOATO.....	162
I.3.1.3. DIFLUFENICAN O N-(2,4-DIFLUOROFENIL)-2-[3-(TRIFLUOROMETIL)FENOXI]	165
I.3.1.4. DIMETOATO O 2-DIMETOXIFOSFINOTIOILTIO-N-METILACETAMIDA.....	168
I.3.1.5. DIURON O 3-(3,4-DICLOROFENIL)-1,1-DIMETILUREA.	170
I.3.1.6. FOSMET U O,O-DIMETIL S-FTALIMIDOMETIL FOSFORODITIOATO.....	173
I.3.1.7. OXYFLUORFEN O 2-CHLORO-A,A,A-TRIFLUORO-P-TOLYL 3-ETHOXY-4-NITROPHENYL ETHER	176
I.3.1.8. TERBUTILAZINA O 6-CLORO-N-(1, 1-DIMETILETIL)-N´-ETIL-1, 3, 5-TRIAZINA-2,4-DIAMINA.	179
<u>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS, OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.</u>	183
II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	185
II.2. OBJETIVOS.....	186
II.3. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO	188
<u>CAPÍTULO III. INSTRUMENTOS, APARATOS, MATERIALES Y REACTIVOS.</u>	191
III.1. REACTIVOS Y MATERIALES.....	193
III.1.1. MUESTRAS DE ACEITUNAS.....	193
III.1.2. DISOLVENTE Y REACTIVOS.	193
III.1.3. SUSTANCIAS PATRÓN.	194
III.1.4. GASES EMPLEADOS.....	194
III.2. INSTRUMENTOS Y APARATOS.....	196
III.2.1. EQUIPO DE EXTRACCIÓN VIBROMATIC®.	196
III.2.2. “KIT” DE FILTRACIÓN A VACÍO.	196
III.2.3. EQUIPO DE MOLTURACIÓN DE ACEITUNA.	196

III.2.4. APARATOS DE HOMOGENIZACIÓN.	197
III.2.5. EQUIPO DE CENTRIFUGACIÓN.....	197
III.3. SISTEMA CROMATOGRÁFICO UPLC-MS	197
III.4. SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-MS	199
CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS MEDIANTE UPLC-MS/MS: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS PESTICIDAS, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	201
IV.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA SEPARACIÓN DE LOS ANALITOS.....	203
IV.2. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES PARA LA DETECCIÓN DE LOS ANALITOS MEDIANTE MS....	204
IV.3. OPTIMIZACIÓN DEL DWELL TIME.....	208
CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS MEDIANTE ANÁLISIS SUPERFICIAL POR EXTRACCIÓN LÍQUIDA (ASEL).	211
V. DETERMINACION DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS MEDIANTE ASEL.....	213
V.1. MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN.	213
V.1.1. MÉTODO DE FORTIFICACIÓN MONOCAPA.	213
V.1.1.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	213
V.1.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	214
V.1.2. MÉTODO DE FORTIFICACIÓN MULTICAPA.....	214
V.1.2.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	214
V.1.2.2. RESULTADOS.	216
V.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN.....	217
V.2.1. SELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN.....	217
V.2.1.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	218
V.2.1.2. RESULTADOS.	219
V.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA RELACIÓN PESO DE MUESTRA/ VOLUMEN EXTRACTANTE	222
V.2.2.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	222
V.2.2.2. RESULTADOS.	222
V.2.3. TIEMPO Y VELOCIDAD DE AGITACIÓN DURANTE LA EXTRACCIÓN.....	224

V.2.3.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	224
V.2.3.2. RESULTADOS CON AGITACIÓN MANUAL.....	225
V.2.3.3. RESULTADOS CON AGITACIÓN MECÁNICA.....	226
V.2.4. EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE EXTRACCIONES.	229
V.2.4.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	229
V.2.4.2. RESULTADOS.	229
V.2.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA DEL DISOLVENTE EN LA EFICACIA DE LA EXTRACCIÓN.	231
V.2.6. CONDICIONES ÓPTIMAS DERIVADAS DEL ESTUDIO DE OPTIMIZACIÓN.	231
V.3. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ EN EL MÉTODO ASEL.	233
V.3.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.....	233
V.3.2. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES PRESENTES EN LA MATRIZ DEL EXTRACTO.	239
V.3.2.1. INTRODUCCIÓN.	239
V.3.2.2. ESTUDIO DEL CONTENIDO EN MATRIZ.	240
V.3.2.3. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS TOTALES.	240
V.3.2.4. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.	242
V.3.2.5. DETERMINACIÓN DE CERAS.....	244
V.3.2.6. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS TRITERPÉNICOS.....	246
V.3.2.7. DETERMINACIÓN DE LA GRASA TOTAL.	247
V.3.2.8. COMPOSICIÓN DEL EXTRACTO.....	248
V.4. EFECTO DE LA PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	249
V.4.1. PURIFICACIÓN A TRAVÉS DE LA MEZCLA DE ADSORBENTES DEL MÉTODO QUECHERS. ...	250
V.4.1.1. INHIBICIÓN DE LA SEÑAL CROMATOGRÁFICA POR EFECTO DE LOS ADSORBENTES.	252
V.4.1.1.1. INTRODUCCIÓN E HIPÓTESIS.	252
V.4.1.1.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	253
V.4.1.1.3. INFLUENCIA EN EL EFECTO MATRIZ.....	254
V.4.1.1.4. RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LAS RECUPERACIONES	255
V.4.2. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS A TRAVÉS DE FLORISIL.....	257
V.4.2.1. CANTIDAD DE MATRIZ RETENIDA POR EL FLORISIL.	257
V.4.2.2. EFECTO SOBRE LAS PENDIENTES DE LAS RECTAS DE CALIBRACIÓN.....	258
V.4.2.3. EFECTO SOBRE LOS PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN.....	261

V.4.2.4. EFECTO DEL LAVADO DE LAS COLUMNAS DE FLORISIL	262
V.4.2.5. CANTIDAD DE MATRIZ CO-ELUIDA TRAS EL LAVADO DE LAS COLUMNAS	265
V.5. INFLUENCIA DEL ESTADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOS PESTICIDAS.....	267
V.5.1. INTRODUCCIÓN.....	267
V.5.2. PARTE EXPERIMENTAL: MUESTRAS Y METODOLOGÍA EMPLEADA.	268
V.5.2.1. INFLUENCIA DE LA MADURACIÓN EN EL MÉTODO ASEL.....	268
V.5.2.2. INFLUENCIA DE LA MADURACIÓN EN EL MÉTODO QUECHERS.	269
V.5.3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	270
V.5.3.1. RESULTADOS PARA MÉTODO ASEL.	270
V.5.3.1.1. INFLUENCIA EN LA PENDIENTE.....	270
V.5.3.1.2. INFLUENCIA EN LA CANTIDAD DE MATRIZ EXTRAÍDA.	276
V.5.3.2. RESULTADOS PARA EL MÉTODO QUECHERS.	277
V.5.3.2.1. INFLUENCIA EN LA PENDIENTE.....	277
V.5.3.2.2. INFLUENCIA EN LA CANTIDAD DE MATRIZ EXTRAÍDA.	282
V.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ASEL DE ACUERDO A LAS RECOMENDACIONES PUBLICADAS POR LA UE A TRAVÉS DE LA GUÍA SANCO/12571/2013.....	283
V.6.1. INTRODUCCIÓN: DEFINICIÓN, MÉTODO DE ENSAYO Y NIVELES DE CONCENTRACIÓN.	283
V.6.2. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	284
V.6.3. CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DE PICO.	286
V.6.3.1. CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DE PICO: CÁLCULO DEL ION RATIO.	287
V.6.3.2. CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DE PICO: CÁLCULO DEL TIEMPO DE RETENCIÓN.	289
V.6.4. SENSIBILIDAD: LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	290
V.6.4.1. METODOLOGÍA SEGUIDA EN LA DETERMINACIÓN DEL LOD Y EL LOQ.	291
V.6.5. LINEALIDAD, RANGO LINEAL Y CALIBRACIÓN.....	294
V.6.5.1. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD, RANGO LINEAL Y CALIBRACIÓN.	296
V.6.6. PRECISIÓN: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.	302
V.6.6.1. REPETIBILIDAD: DETERMINACIÓN Y RESULTADOS.	302
V.6.6.2. REPRODUCIBILIDAD: DETERMINACIÓN Y RESULTADOS.....	304
V.6.7. EXACTITUD.	305

V.6.7.1. EXACTITUD: DETERMINACIÓN Y RESULTADOS.	307
V.6.7.1.1. ESTIMACIÓN DEL VALOR DE REFERENCIA O VERDADERO.....	307
V.6.7.1.2. EXACTITUD DEL MÉTODO ASEL: SESGO Y RECUPERACIÓN.....	310
V.7. EFECTO DEL LAVADO PREVIO DEL FRUTO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOS PESTICIDAS APLICANDO EL MÉTODO ASEL.	315
V.7.1. INTRODUCCION: ANTECEDENTES.....	315
V.7.2. METODOLOGÍA EMPLEADA.	316
V.7.3. ESTUDIO DE LA CANTIDAD DE MATRIZ ELIMINADA POR EL LAVADO.....	319
V.7.4. INFLUENCIA DEL LAVADO DEL FRUTO SOBRE EL EFECTO MATRIZ.....	320
V.7.5. INFLUENCIA DEL LAVADO EN ACEITUNAS DE VUELO.....	323
V.7.6. INFLUENCIA DEL LAVADO EN ACEITUNAS DE SUELO.	324
V.8. COMPARACIÓN DEL MÉTODO ASEL CON OTROS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS.	327
V.8.1. INTRODUCCION: JUSTIFICACIÓN.....	327
V.8.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON ULTRATURRAX Y PURIFICACIÓN CON FLORISIL.	328
V.8.2.1. INTRODUCCIÓN.	328
V.8.2.2. METODOLOGÍA.....	329
V.8.2.3. RESULTADOS.	331
V.8.2.3.1. CANTIDAD DE MATRIZ CO-EXTRAÍDA.....	331
V.8.2.3.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.	331
V.8.2.3.3. ESTUDIO DE RECUPERACIÓN EN MUESTRAS FORTIFICADAS.	332
V.8.3. ESTUDIO Y CUANTIFICACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR RESIDUOS DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS A TRAVÉS DEL MÉTODO QUECHERS.	334
V.8.3.1. INTRODUCCIÓN.	334
V.8.3.2. METODOLOGÍA.....	335
V.8.3.3. RESULTADOS.	336
V.8.3.3.1. CANTIDAD DE MATRIZ CO-EXTRAÍDA.....	336
V.8.3.3.2. EFECTO MATRIZ EN EL MÉTODO QUECHERS.....	337
V.8.3.3.3. ESTUDIO DE RECUPERACIÓN EN MUESTRAS FORTIFICADAS.	339
V.8.4. ESTUDIO Y CUANTIFICACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR RESIDUOS DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS A TRAVÉS DEL MÉTODO ASEL.	340

V.8.4.1. INTRODUCCIÓN.....	340
V.8.4.2. METODOLOGÍA.....	340
V.8.4.3. RESULTADOS	342
V.8.4.3.1. CANTIDAD DE MATRIZ CO-EXTRAÍDA.....	342
V.8.4.3.2. EFECTO MATRIZ DEL TRATAMIENTO ASEL.....	343
V.8.4.3.3. RESULTADOS OBTENIDOS.....	344
V.8.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS METODOLOGÍAS EN ESTUDIO.....	345
V.8.5.1. COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE MATRIZ CO-EXTRAÍDA.....	345
V.8.5.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.....	346
V.8.5.3. ANÁLISIS DE LOS PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN.....	348
V.8.5.4. COMPARACIÓN CON OTROS RESULTADOS RECOGIDOS EN LA BIBLIOGRAFÍA.....	352
V.9. APLICACIÓN DEL MÉTODO ASEL EN MUESTRAS REALES.....	355
V.9.1. APLICACIÓN DEL MÉTODO ASEL EN MUESTRAS DE VUELO.....	356
V.9.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO ASEL EN MUESTRAS DE SUELO.....	358
CONCLUSIONES.....	361
REFERENCIAS.....	369
ANEXOS.....	398

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.1. Clasificación de los principales grupos de pesticidas atendiendo a su aparición cronológica.....	40
Tabla I.1.2. Clasificación de los plaguicidas en función de la peligrosidad. Resumen de contenidos. (Fuente OMS, 2009).....	45
Tabla I.1.3. Resumen de las principales familias de herbicidas empleados en la actualidad. Depósito de documentos de la FAO. Departamento de Agricultura.	50
Tabla I.1.4. Principales factores que influyen en la persistencia de los pesticidas al suelo.	59
Tabla I.1.5. Propiedades físicas y tóxicas de los más importantes disolventes de extracción. (*) 25°C.	71
Tabla I.1.6. Resumen de los principales métodos de determinación de pesticidas.	95
Tabla I.1.7. Tipos de cromatografía líquida en función de la columna utilizada.	100
Tabla I.1.8. Comparación de las capacidades de los diferentes analizadores de masas.....	111
Tabla I.2.1. Principales plagas de insectos que afectan al cultivo del olivo.	120
Tabla I.2.2. Modo de acción, comportamiento en el suelo y forma de empleo de los herbicidas más empleados en el olivar.	121
Tabla I.2.3. LMR expresados como mg·kg ⁻¹ de los principales plaguicidas usados en el cultivo del olivo. Fuente: EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005 (MRLs updated on 07/07/2015).	127
Tabla I.2.4. Resumen de las principales modificaciones del método QuEChERS para la determinación de residuos de pesticidas en matrices alimentarias en función del tipo de matriz.	140
Tabla I.2.5. Comparativa de los resultados obtenidos con dos procedimientos de análisis de pesticidas (QuEChERS y MSPD) para la determinación de los pesticidas Dimetoato, Diuron y TBA (artículos publicados por Bienvenida Gilber-López et al. en el año 2010 ^{216,217}).	153
Tabla I.3.1. Resumen de las principales características físico-químicas de los pesticidas objeto de estudio.	159
Tabla I.3.2. Principales métodos de determinación del Amitrol descritos en la literatura.	158
Tabla I.3.3. Principales técnicas de determinación del Clorpirifos en diferentes matrices.	161
Tabla I.3.4. Principales técnicas de determinación del Diflufenican en diferentes matrices.....	165
Tabla I.3.5. Principales técnicas de determinación del Dimetoato en diferentes matrices.....	167
Tabla I.3.6. Diferentes métodos de determinación del Diuron en diferentes matrices.	170
Tabla I.3.7. Principales métodos de determinación del Fosmet en diferentes matrices.	173
Tabla I.3.8. Principales técnicas de determinación del Oxifluorfen en diferentes matrices.	175

Tabla I.3.9. Resumen de las principales técnicas de determinación de la TBA en diferentes matrices.	178
Tabla III.1.1. Materiales y Reactivos empleados en las etapas de purificación.	192
Tabla IV.1.1. Condiciones finales de la fase móvil.	202
Tabla IV.2.1. Condiciones establecidas en el MS para cada una de las dos transiciones necesarias para la identificación inequívoca de cada pesticida.	205
Tabla V.1.1. Recuperaciones medias (n=5) obtenidas a través del análisis de muestras de aceitunas fortificadas en multicapa a tres niveles de concentración de 20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ por GC-MS.	214
Tabla V.2.1. Cantidad de matriz absoluta extraída empleando diferentes disolventes de extracción, expresada en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de aceituna procesada.....	217
Tabla V.2.2. Recuperaciones medias para muestras dopadas a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (n=5) usando diferentes disolventes de extracción empleando 5 min de agitación manual.....	218
Tabla V.2.3. Recuperaciones obtenidas a partir de aceitunas dopadas a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (n=5) a diferentes tiempos de extracción manual.....	223
Tabla V.2.4. Recuperaciones medias (RSDs) obtenidas a partir del ensayo de extracción ASEL sobre muestras fortificadas con una y dos extracciones (n=5).	228
Tabla V.3.1. Parámetros correspondientes a las recta de calibrado en disolvente y en matriz. El rango lineal fue de 10-300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (n=5). El efecto matriz viene expresado como relación entre la pendiente de la recta de calibrado en matriz y la pendiente de la recta en disolvente.....	234
Tabla V.3.2. Contenido medio (n=3) de pigmentos en los extractos de aceitunas.....	239
Tabla V.3.3. Contenido en Polifenoles Totales ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de extractos en ACN (n=5).	242
Tabla V.3.4. Concentración en ceras del extracto en ACN.	244
Tabla V.3.5. Concentración media (RSDs) de triterpenos del extracto en ACN (n=3).	244
Tabla V.3.6. Cantidad de grasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) presente en el extracto de ACN (n=3).....	245
Tabla V.3.7. Componentes presentes en la matriz del extracto procedente del método ASEL. ..	246
Tabla V.4.1. Efecto Matriz y relación de pendientes en rectas procedentes de diferentes tratamientos: A, recta en disolvente sin tratamiento de clean up; B, recta procedente de extractos con saturación de ACN en aceite sometida a clean up; C, recta en disolvente sometida a clean up.....	253
Tabla V.4.2. Efecto sobre la recuperación (n=5) a causa de la presencia o ausencia de grasa en los extractos sometidos al procedimiento de clean up del método QuEChERS.	254
Tabla V.5.1. Muestras seleccionadas para el análisis de la influencia del estado de maduración. En la tabla se muestran la fecha de recogida y el estado de maduración de las aceitunas seleccionadas para cada uno de los dos métodos de extracción.	266

Tabla V.5.2. Parámetros de regresión lineal para las rectas de calibrado (n=3) para cada uno de los pesticidas en estudio en función del nivel de maduración ensayado. N.M. Nivel de Maduración.	271
Tabla V.5.3. Relación de pendientes medias (n=3) a partir del tratamiento de extracción QuEChERS para cada uno de los pesticidas en estudio en función del nivel de maduración (N.M.) ensayado.	278
Tabla V.6.1. Evaluación del ion ratio para los pesticidas en disolvente y en matriz a partir del extracto fortificado a tres niveles de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). La tolerancia máxima permitida fue de $\pm 30\%$	286
Tabla V.6.2. Tiempos de retención medios e intervalos de confianza para una distribución normal al 95% para cada uno de los pesticidas en estudio. Datos expresados en min.	287
Tabla V.6.3. Evaluación del LOD y LOQ para los pesticidas a partir del extracto fortificado a diferentes niveles de concentración. En la tabla se muestran los valores para las últimas 4 concentraciones ensayadas para cada uno de los pesticidas. Los valores destacados en verde corresponden a los valores hallados para el LOD, mientras que en color rojo se muestran los valores correspondientes al LOQ.	291
Tabla V.6.4. Evaluación del LOD y LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) para cada uno de los pesticidas siguiendo el método Eurachem.	292
Tabla V.6.5. Evaluación de los Factores Respuesta (FR = y/x) para cada uno de los pesticidas en rectas en disolvente y en matriz. Los valores mostrados corresponden a la media encontrada en los cinco días de ensayo de validación.	298
Tabla V.6.6. P Parámetros de calibración para rectas realizadas en matriz y en disolvente. Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas en días distintos. El Efecto Matriz fue expresado como la relación de pendientes correspondiente a la recta de calibrado en matriz frente a la de disolvente.	299
Tabla V.6.7. Repetibilidad del método ASEL en muestras fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	302
Tabla V.6.8. Precisión Inter-día. Los valores corresponden a la concentración media (n=5) obtenida tras la inyección de un único extracto ASEL procedente de muestras fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	303
Tabla V.6.9. Recuperaciones medias (n=15) obtenidas tras la aplicación del método ASEL en muestras de aceitunas que fueron fortificadas a tres niveles de concentración directamente en disolución y porcentaje de error relativo asociado.	306
Tabla V.6.10. Análisis de la varianza de un factor para seis de los pesticidas en estudio. Los resultados pertenecen a las recuperaciones medias de 5 extractos diferentes realizados durante 5 días consecutivos.	307
Tabla V.6.11. Recuperaciones medias (RSD) y error sistemático asociado para cada uno de los pesticidas en estudio procedentes de un ensayo ASEL realizado a partir de muestras fortificadas a $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (n=15).	309

Tabla V.6.12. Recuperaciones medias (RSD) para cada uno de los pesticidas en estudio procedentes de un ensayo a 3 niveles de concentración (n=15).	310
Tabla V.6.13. Análisis de la varianza de un factor para seis de los pesticidas en estudio. Los resultados pertenecen a las recuperaciones medias de 5 ensayos en días distintos empleando muestras a tres niveles de fortificación.	311
Tabla V.7.1. R Reduccion de la cantidad de matriz (mg de extracto seco por gramo de aceituna) extraída por el método ASEL en aceitunas del suelo al introducir una etapa de lavado.....	318
Tabla V.7.2. Parámetros analíticos de las rectas de calibrado por UPLC-MS/MS con y sin etapa previa de lavado.....	319
Tabla V.7.3. Recuperaciones medias (n=5) en muestras de aceitunas de vuelo fortificadas a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ que fueron analizadas por UPLC-MS/MS tras el empleo del método ASEL con agua.	322
Tabla V.7.4. Residuos de pesticidas encontrados en muestras de aceitunas de suelo tras la aplicación del método ASEL con y sin etapa previa de lavado y analizados por UPLC-MS/MS. (Resultados expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).	323
Tabla V.8.1. Cantidad media de matriz co-extraída (n=5) en la pasta de aceituna a partir de una extracción sólido-líquido con ACN y Florisil.	329
Tabla V.8.2. Evaluación del Efecto Matriz en el método de extracción con Ultraturrax y purificación con Florisil empleando UPLC-MS/MS. El rango lineal fue estudiado entre 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	330
Tabla V.8.3. Recuperaciones medias (n=5) obtenidas con el método de extracción con homogenización de la pasta y purificación con Florisil a tres niveles de concentración. Las muestras se analizaron por UPLC-MS/MS y el oxifluorfen por GC-MS (Regresión lineal en Disolvente $y= 109,03x-1880,82$; $r^2=0,9950$ mientras que en Matriz $y=144,97x-658,37$ con un $r^2=0,9994$. Efecto Matriz del 33%).	331
Tabla V.8.4. Cantidad de matriz co-extraída por el método QuEChERS. Los valores corresponden a la cantidad media (n=5) de matriz en peso seco de extractos pesados antes y después de la etapa de clean up.	335
Tabla V.8.5. Evaluación del Efecto Matriz en rectas (n=5) elaboradas en disolvente y en matriz procedente del método QuEChERS por UPLC-MS/MS. El rango lineal estudiado fue desde 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	336
Tabla V.8.6. Porcentajes de recuperación medios (n=5) obtenidos a través del método QuEChERS en muestras fortificadas directamente en la masa a tres niveles de concentración.....	337
Tabla V.8.7. Cantidad de matriz media (n=5) co-extraída por el tratamiento ASEL con clean up empleando columnas de Florisil.	340
Tabla V.8.8. Evaluación del Efecto Matriz del método ASEL con o sin empleo de etapa de purificación con Florisil. El rango lineal estudiado fue desde 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	341
Tabla V.8.9. Porcentajes de recuperación medios (n=5) obtenidos tras la aplicación del método ASEL sobre aceitunas fortificadas a tres niveles de concentración. Las muestras se analizaron por UPLC-MS/MS y el oxifluorfen por GC-MS (Regresión lineal en Disolvente $y= 109,03x-$	

1880,82; $r^2=0,9950$ mientras que en Matriz $y=139,48x-503,83$ con un $r^2=0,9995$. Efecto Matriz del 28%).	342
Tabla V.8.10. Cantidad de matriz co-extraída (RSD) en los tres tratamientos en estudio. CU: clean up.	343
Tabla V.8.11. Comparación de los métodos ASEL, QuEChERS y extracción con ULtraturrax + Florisil en función de sus porcentajes de recuperación a través del análisis estadístico de la varianza de un factor ANOVA.	347
Tabla V.8.12. Resumen de las principales características de los procedimientos de extracción en estudio: ASEL, Quechers y homogeneizador.	349
Tabla V.8.13. Recuperaciones medias obtenidas a través de la aplicación de diferentes procedimientos de extracción y determinación de pesticidas en muestras de aceitunas fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	350
Tabla V.9.1. Contenido en pesticidas obtenido tras la aplicación del método ASEL en 33 muestras de aceitunas de vuelo analizadas por UPLC-MS/MS. Los resultados vienen expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ como la media \pm sd (RSDs). *LMR a fecha de 07/07/2015 a través de Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) N ^o 396-2005.	355
Tabla V.9.2. Contenido en pesticidas obtenido tras la aplicación del método ASEL en 21 muestras de aceitunas de suelo analizadas por UPLC-MS/MS* y GC-MS**. Los resultados vienen expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ como la media \pm sd (RSDs). LMR a fecha de 07/07/2015 a través de Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) N ^o 396-2005.	356

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.1. Venta de fitosanitarios (exportaciones) en los mercados europeo y mundial durante los años 2008-2013 ^{12,13}52

Figura I.1.2. Mercado de fitosanitarios a nivel nacional durante el período 2000-2013.53

Figura I.1.3. Porcentajes de fitosanitarios por familias de productos comercializados en España en 2012. La clasificación ha sido realizada teniendo en cuenta los principales grupos según Anexo del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas.54

Figura I.1.4. Consumo de productos fitosanitarios (kg/ha) por Comunidades Autónomas según el Perfil Ambiental de España 2013 sección 2.9 editado por MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) referente al ejercicio del 2012 ¹⁹.55

Figura I.1.5. Porcentaje del Consumo de Productos Fitosanitarios por Comunidades Autónomas según la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE) ¹⁸ y la Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (AEPLA) ¹².56

Figura I.1.6. Secuencia de pasos general para un procedimiento SPE o de extracción en fase sólida.81

Figura I.1.7. Esquema representativo de una sección de una columna de GPC mostrando como tendría lugar la elución en función del tamaño.88

Figura I.1.8. Esquema general del funcionamiento de un Espectrómetro de Masas.105

Figura I.1.9. Esquema general del funcionamiento de un analizador MS/MS o triple cuadrupolo.114

Figura I.1.10. Etapas de la interfase ESI o ionización por electrospray.117

Figura I.2.1. Montaje experimental requerido para un método de GPC.131

Figura I.2.2. Esquema del método QuEChERS empleando tampón acetato durante la etapa de extracción en sustitución del NaCl. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas en verduras publicado en el año 2011 por Béla Kmetz et al. ²⁰⁰.141

Figura I.2.3. Esquema del método QuEChERS empleando tampón citrato durante la etapa de extracción. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas organoclorados en frutas publicado en el año 2011 por Ewa Cieslik et al. ²¹¹.142

Figura I.2.4. Esquema del método QuEChERS original empleando varios adsorbentes durante la etapa de purificación. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas en aceitunas publicado en el año 2007 por S. Cunha et al. ²¹⁵.144

Figura I.2.5. Esquema del método QuEChERS original empleando varios adsorbentes durante la etapa de purificación. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas en aceite de oliva publicado en el año 2007 por S. Cunha et al. ²¹⁵.145

Figura I.2.6. Esquema de un procedimiento MSPD para el análisis de pesticidas en aceitunas. .148

Figura I.2.7. Esquema de un procedimiento MSPD para el análisis de pesticidas en aceite de oliva. EPSA o Éter petróleo saturado con ACN y ASEP o Acetonitrilo saturado con Éter Petróleo. .	149
Figura I.3.1. Sistema cromatográfico UPLC-MS/MS (Waters Acquity, Reino Unido).....	197
Figura I.3.2. Sistema cromatográfico de GC-MS (Varian 2000).	198
Figura IV.1.1. Optimización del Dwell Time a partir de tres concentraciones diferentes de pesticidas en ACN. Los resultados corresponden a la media de 5 repeticiones por concentración y tiempo	207
Figura V.2.1. Recuperaciones medias (n=5) a partir de muestras fortificadas a 100 µg·kg ⁻¹ , empleando tres tipos distintos de relación volumen extractante/peso de muestra a partir de ensayos ASEL durante 5 min de agitación manual.	221
Figura V.2.2. Recuperaciones medias (n=5) en función de la velocidad de agitación a un mismo tiempo de extracción (5min).	225
Figura V.2.3. Recuperaciones medias (n=5) en función del tiempo a una misma velocidad de agitación mecánica de 750opm.	226
Figura V.3.1. Relación de pendientes en matriz y en disolvente para tres pesticidas con un Efecto Matriz “suave”, es decir, < 20%. Las figuras corresponden a las rectas medias (n=5) de los pesticidas Diflufenican, Diuron y Terbutilazina. Las rectas en color verde corresponden a las rectas en disolvente, mientras que las rectas en color amarillo representan las rectas de calibrado en matriz.	235
Figura V.3.2. Relación de pendientes en matriz y en disolvente para los pesticidas Fosmet y Dimetoato con un Efecto Matriz “medio”, es decir, 20-50%. Las rectas en color verde corresponden a las rectas en disolvente, mientras que las rectas en color amarillo representan las rectas en matriz.	236
Figura V.3.3. Relación de pendientes en matriz y en disolvente para los pesticidas Clorpirifos, Amitrol y Oxifluorfen con un Efecto Matriz “fuerte”, es decir, > 50%. Las rectas en color verde corresponden a las rectas en disolvente, mientras que las rectas en color amarillo representan las rectas en matriz.	236
Figura V.3.4. Curva de calibrado del ácido cafeico por lectura espectrofotométrica a 725 nm...	242
Figura V.4.1. Recuperaciones obtenidas (n=5) por extracción ASEL con y sin etapa de purificación de extractos del método QuEChERS a partir de muestras fortificadas a 250 µg·kg ⁻¹	249
Figura V.4.2. Comparación de rectas calibradas en disolvente y en matriz ASEL con o sin paso por Florisil. Las figuras corresponden a las rectas medias (n=5) de los pesticidas Diflufenican, Fosmet, Diuron, Terbutilazina, Dimetoato y Amitrol.....	258
Figura V.4.3. Porcentajes de recuperación medios (n=5) para muestras fortificadas en disolución a 250 µg·L ⁻¹ sometidas a tratamiento ASEL con o sin etapa de purificación con Florisil.	260
Figura V.4.4. Recuperaciones medias (n=3) en función del volumen de lavado en muestras fortificadas a 100 µg·kg ⁻¹ con y sin etapa de purificación por Florisil. Las columnas fueron lavadas con diferentes cantidades de ACN. Los pesticidas Clorpirifos, Amitrol y Oxifluorfen no fueron evaluados en este estudio.	262

Figura V.4.5. Porcentajes de matriz co-eluída a partir de extractos purificados con Florisil que fueron posteriormente lavados con diferentes cantidades de ACN.....	264
Figura V.5.1. Evolución de las pendientes de las rectas de calibrado en matriz procedente del método de ASEL en función del estado de maduración para cada uno de los pesticidas en estudio.....	270
Figura V.5.2. Cantidad de matriz extraída por el método ASEL (expresada como mg de matriz por cada gramo de aceituna) en cada uno de los estados de maduración estudiados (n=3). (N.M: o nivel de maduración).....	274
Figura V.5.3. Evolución del valor de las pendientes de las rectas de calibrado en matriz procedente del método de QuEChERS en función del nivel de maduración (N.M.) de las aceitunas para cada uno de los pesticidas en estudio.....	277
Figura V.5.4. Cantidad de matriz media extraída por el método QuEChERS (expresada como mg de matriz por cada gramo de pasta de aceituna) para cada uno de los niveles de maduración (N.M.) estudiados. Los valores mostrados corresponden a la media de un total de tres extracciones por estado de maduración.....	280
Figura V.6.1. Cromatogramas correspondientes al conjunto de pesticidas en estudio a partir de un extracto ASEL fortificado a 100 µg·kg ⁻¹ (negro) frente a un blanco de aceitunas (rojo)	284
Figura V.6.2. Factores Respuesta vs. Concentración para cada uno de los pesticidas en estudio a las distintas concentraciones ensayadas, tanto en rectas de calibrado en disolvente como en matriz.....	297
Figura V.7.1. Esquema del procedimiento de las muestras desde su recepción, lavado y filtrado previo a su inyección por UPLC o GC-MS.....	316
Figura V.7.2. Tendencia de las rectas calibradas en disolvente y en matriz con o sin etapa de lavado, en pesticidas determinados por UPLC-MS/MS.....	320
Figura V.8.1. Tratamiento de extracción de pesticidas basado en una extracción S-L con ACN, homogenización con Ultraturrax y purificación de los extractos obtenidos con columnas de Florisil de 2g.....	328
Figura V.8.2. Esquema de los diferentes tratamientos del extracto ASEL para su posterior análisis cromatografico.	339
Figura V.8.3. Comparación del Efecto Matriz en función del pesticida y del procedimiento aplicado: ASEL sin clean up, Extracción con homogeneizador + SPE con Florisil y Extracción QuEChERS con clean up.	346

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACRÓNIMOS POR ORDEN ALFABÉTICO

- ACN; Acetonitrilo.
- AEPLA; Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas.
- APCI; Atmospheric Pressure Chemical Ionization.
- API; Atmospheric Pressure Ionization.
- ASEL; Análisis Superficial por Extracción Líquida.
- ASEP; acetonitrilo saturado en éter petróleo.
- BPA; Buenas Prácticas Agrícolas.
- CID; Collision Induced Dissociation.
- DAD; Diode Array Detector.
- DDT; DicloroDifenilTricloroetano.
- ECD, Electron Capture Detector.
- EFSA; European Food Safety Authority.
- EI; Electronic Ionization.
- ELISA; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.
- EPA; United States Environmental Protection Agency.
- EPSA; éter petróleo saturado en acetonitrilo.
- ESI; Electrospray Ionization.
- ESYRCE; Encuesta Sobre Superficies Y Rendimientos Cultivos.
- FAB; Fast Atom Bombardment.
- FAO; Food and Agriculture Organization.
- FDA; Food and Drug Administration.
- FID, Flame Ionization Detector.
- GAP; Good Agricultural Practices for Pesticides Uses.
- GC; Gas Chromatography.
- GCB; Graphitized Carbon Black.
- GC-MS; Gas Chromatography- Mass Spectrometry.
- GPC; Gel Permeation Chromatography.
- HETP; Height Equivalent to Theoretical Plate.
- HILIC; Hydrophilic Interaction Chromatography.

- HPLC; High Performance Liquid Chromatography.
- HS-SPME; Head Space - Solid Phase MicroExtraction.
- IC; Chemical Ionization.
- IDA; Ingesta Diaria Admisible.
- IEC; Ion Exchange Chromatography.
- IPC; Ion-Pair Chromatography.
- IT, Ion Trap.
- LC-MS; Liquid Chromatography- Mass Spectrometry.
- LD₅₀; Dosis Letal 50.
- LMR; Límite Máximo de Residuos.
- LOD; Limit of Detection.
- LOQ; Limit of Quantification.
- MAE; Microwave Assisted Extraction.
- MAGRAMA; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- MALDI; Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization.
- MDGC; Multidimensional Gas Chromatography.
- MDLC; Multidimensional Liquid Chromatography.
- MetOH; metanol.
- MRM; Multiple Reaction Monitoring.
- MS, Mass Spectrometer.
- MSPD; Matrix Solid Phase Dispersion.
- NARP-LC; Non Aqueous Reversed-Phase Liquid Chromatography.
- NPD, Nitrogen-Phosphorus Detector.
- NPLC; Normal Phase Liquid Chromatography.
- OMS; Organización Mundial de la Salud.
- opm; oscilaciones por minuto.
- PCBs; PolyChlorinated Biphenyls.
- PLE; Pressure Liquid Extraction.
- ppb; partes por billón.
- ppm; partes por millón.
- PSA; Primary Secondary Amine.

- QuEChERS; Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe.
- rcf; relative centrifugal force.
- RPCLC; Reversed Phase Liquid Chromatography
- rpm; revoluciones por minuto
- SCAI; Servicio Central de Apoyo a la Investigación (Universidad de Córdoba).
- SEC; Size Exclusion Chromatography.
- SFE; Supercritical Fluid Extraction.
- SPE; Solid Phase Extraction.
- SPME; Solid Phase MicroExtraction.
- TBA; Terbutilazina.
- TOF; Time of Flight.
- TOTAD; Through Oven Transfer Adsorption Desorption.
- TQD; Triple Quadrupole Detector.
- UPLC; Ultra Performance Liquid Chromatography.
- VOO; Virgen olive oil.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS PLAGUICIDAS: EVOLUCIÓN, CLASIFICACIÓN, APLICACIONES, LEGISLACIÓN Y MÉTODOS DE ANÁLISIS.

I.1.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS PLAGUICIDAS.

I.1.1.1. Breve Evolución Histórica de los Plaguicidas.

Los plaguicidas o pesticidas son sustancias químicas que se emplean para combatir los agentes causantes de plagas y enfermedades de los cultivos con el objetivo de conseguir una producción óptima en cantidad y calidad.

El origen del empleo de los pesticidas es impreciso aunque se cree que el primer uso registrado de un insecticida fue hace unos 4.500 años por los sumerios, quienes utilizaban compuestos de azufre para controlar insectos y ácaros ¹. Además, han sido encontrados algunos escritos del año 1000 a.C. donde *Homero* mencionaba el uso de azufre como fumigante para evitar enfermedades o del año 300 a.C. donde *Teofrasto* describía algunas enfermedades actuales de las plantas. Mucho más tarde, *Plinio* (79 d.C.) defendió el uso de arsénico como insecticida que sería de común aplicación para los chinos en el año 900 d.C.

Entre los siglos XVII-XVIII se desarrollaron pesticidas como el cloruro de mercurio o el sulfato de cobre para inhibir la aparición de esporas y además fue utilizado lo que hoy se conoce como el primer insecticida de origen

natural, la nicotina. Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XIX cuando empezaron a aplicarse sistemáticos métodos científicos al problema del control de plagas agrícolas. Así, fueron desarrollados dos insecticidas naturales importantes como la rotenona o el piretro, que actualmente se siguen utilizando para combatir plagas de insectos ². Casi al final de este siglo, *Millardet* descubrió accidentalmente un tratamiento químico valioso para el control de hongos patógenos que consistía en una mezcla de sulfato de cobre, cal y agua que demostró ser eficaz contra el *Mildíu* de la vid. Hasta la década de 1930, los pesticidas a base de arsénico eran dominantes, sin embargo se observó que eran muy tóxicos y pronto comenzaron a buscarse otras alternativas ³.

Sustancias como cenizas, azufre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc y plomo, etc. forman lo que se conoce como el grupo de los llamados *pesticidas de la 1ª generación*. Son productos en general muy tóxicos, poco efectivos en la lucha contra la plaga y muy persistentes en el ambiente (hasta 50 años). Hoy día se usan muy poco y bastantes de ellos están incluso prohibidos por su excesiva toxicidad.

La década de 1930 realmente representa el comienzo de la era moderna de los pesticidas sintéticos orgánicos, importantes ejemplos incluyen la introducción de insecticidas como tiocianato de alquilo, fungicidas orgánicos e insecticidas.

Los avances de la ciencia y de la industria química hicieron posible la aparición de los *pesticidas de la 2ª generación*. Son un variado conjunto de moléculas que se clasifican en grupos según su estructura química. Las familias más importantes son los organoclorados, los organofosforados, los carbamatos y los piretroides.

En 1939 *Müller* descubrió las poderosas propiedades insecticidas del diclorodifeniltricloroetano o DDT. En 1943, el DDT fue fabricado por primera vez y pronto se convirtió en el insecticida más utilizado en todo el mundo. Décadas después (1962) se puso de manifiesto su alta toxicidad para el medio ambiente y los seres humanos, encontrándose residuos de DDT en todos los eslabones de la cadena alimentaria. En la actualidad, el uso agrícola del DDT está prohibido en virtud del *Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes* ⁴, aunque todavía se utiliza en algunos países en desarrollo para prevenir la malaria y otras enfermedades tropicales mediante pulverización en las paredes interiores para matar o repeler los mosquitos ⁵.

En 1950 el malatión fue creado como el primer ejemplo de insecticida organofosforado de amplio espectro de acción a la vez que de baja toxicidad para los mamíferos, y casi al mismo tiempo, el ácido fenoxiacético fue desarrollado como herbicida para el control de malas hierbas en cultivos de cereales. Estos compuestos tienen una toxicidad relativamente baja para los mamíferos y son por lo tanto, seguros de usar.

No fue hasta la década de los 60 cuando aparecieron en el mercado los fungicidas sistémicos que incluyen antibióticos, morfina, compuestos organofosforados, y más recientemente, los inhibidores de la biosíntesis de esteroides, como las triazinas.

En los últimos años, los grandes avances en manipulación genética ofrecen la posibilidad de crear cultivos con capacidad genética para eliminar o inhibir las plagas que causan enfermedades ⁶. Así han sido desarrollados los llamados *pesticidas de 3ª, 4ª y hasta 5ª generación*, aunque los más utilizados en la actualidad siguen siendo los de la 2ª generación (**Tabla I.1.1.**).

Tabla I.1.1. Clasificación de los principales grupos de pesticidas atendiendo a su aparición cronológica.

Orden Cronológico	Familia	Ejemplos
1ª Generación	Inorgánicos	Arsénico
	Orgánicos Vegetales	Nicotina, Rotenona
	Orgánicos Minerales	Aceites Minerales
2ª Generación (Orgánicos Sintéticos)	Organoclorados	DDT, Heptacloro
	Organofosforados	Malatión, Paratión
	Carbamatos	Carbaril, Carbofuran
	Piretroides	Deltametrina, Cipermetrina
3ª Generación	Microbianos	Feromonas
4ª Generación	Hormonas Juveniles	Diflubenzuron, Metroprene
5ª Generación	Antihormonas	Vegetal (Precocenos)
		Microorganismos (Avermectin)

I.1.1.2. Los plaguicidas y su clasificación.

El diccionario de la *Real Academia de la Lengua Española* ⁷ designa el término pesticida como un adjetivo (usado también como sustantivo) cuyo significado es "que se destina a combatir plagas".

El término Pesticida es un *anglicismo* procedente del latín donde "pest" se corresponde con el término español *plaga*, mientras que la raíz "coedere" (matar) señala la intención de luchar contra agentes de origen biológico (plagas), de ahí que se acuñe el término español, plaguicida, donde *plaga* hace referencia a la aparición masiva y repentina de seres vivos de la misma especie que causan graves daños a poblaciones animales o vegetales, y *-cida*, matador o exterminador. Otros términos que suelen ser sinónimos son productos fitosanitarios, parasiticidas, productos agroquímicos o productos fitofarmacéuticos.

Según la FAO (*Food and Agriculture Organization, 2004*) ⁸ se define pesticida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que de otra manera interfieren con la producción, transformación, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o sustancias que puedan administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas. El término

incluye también a las sustancias destinadas para su uso como reguladores de crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para el adelgazamiento del fruto o la prevención de la caída prematura de la fruta. Además, también se utiliza como sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y el transporte.

Los plaguicidas constituyen un grupo de compuestos muy amplio y heterogéneo, por lo que existen diversas posibilidades de clasificación, entre ellas el tipo de organismo a controlar, criterios físico-químicos, en función de la toxicidad, aplicaciones, tratamientos, etc. No obstante, debido a la gran variedad de plaguicidas que existen, ninguna clasificación resulta completa.

En la actualidad existe en el mercado un gran número de plaguicidas específicos para cada grupo de agente nocivo. Así, podemos clasificar a los plaguicidas en:

- ✓ Insecticidas, controlan insectos
- ✓ Fungicidas, actúan contra hongos
- ✓ Herbicidas, para combatir las malas hierbas
- ✓ Acaricidas, para combatir los ácaros
- ✓ Nematicidas, para el control de nemátodos
- ✓ Antibióticos o bactericidas, contra las bacterias
- ✓ Helicidas, para el control de babosas y caracoles

- ✓ Rodenticidas, contra roedores en general
- ✓ Fitorreguladores y productos afines
- ✓ Protectores de maderas, fibras y derivados

Recientemente la Organización Mundial de la Salud u OMS ha realizado una clasificación de los plaguicidas por orden de peligrosidad tomando como referencia la dosis letal (LD) promedio oral o cutánea. Esta medición llamada LD₅₀ se calcula midiendo el número de miligramos de componente activo por kilogramo del peso del cuerpo, necesario para matar el 50% de un muestreo de animales (generalmente ratas). Aunque también se debe tener en cuenta que un producto con una baja dosis letal media (LD₅₀) puede causar efectos crónicos por exposición prolongada.

Teniendo esto en cuenta, cada plaguicida puede ser clasificado dentro de cuatro categorías⁹⁻¹¹: IA o extremadamente peligroso, IB o altamente peligroso, II o moderadamente peligroso y categoría III o ligeramente peligroso. Un resumen de todos los peligros con sus correspondientes categorías se puede ver reflejado en la **Tabla I.1.2**.

Además de estas categorías existen otros tres grupos de plaguicidas como el **Grupo V**, que incluye a aquellos productos que no implican un riesgo agudo cuando se usan normalmente (LD₅₀ oral \geq 2000 mg/Kg y 3000 mg/Kg para sólidos y líquidos, respectivamente). El **Grupo VI** designaría a aquellos productos a los que no se les sitúa en ninguna categoría y el **Grupo VII** englobaría fumigantes gaseosos o volátiles.

Debido a que los agricultores en los países en desarrollo a menudo no disponen de la capacitación o los equipos para hacer un manejo seguro de los plaguicidas, la FAO recomienda que los plaguicidas de las categorías IA, IB y, preferentemente II, no sean utilizados en los países en desarrollo. Sin embargo, se continúa distribuyendo y vendiendo plaguicidas extremadamente peligrosos en los países en desarrollo, lo cual constituye un potencial peligro para el medio ambiente así como para la salud animal y humana. (En el **Tabla I.1.3.** puede verse una clasificación de los herbicidas más ampliamente difundidos según la FAO).

Tabla I.1.2. Clasificación de los plaguicidas en función de la peligrosidad. Resumen de contenidos. (Fuente OMS, 2009).

CATEGORÍA DE PELIGRO	TIPOS Y DECLARACIÓN DE RIESGO		CARACTERÍSTICAS
I. EXPLOSIVOS	I.A. INESTABLES		I.A.1. PELIGRO
	I.B. ESTABLES		I.B.1. Masa de peligro de explosión
			I.B.2. Peligro de explosión
			I.B.3. Peligro de incendio, explosión o proyección
			I.B.4. Peligro de incendio o proyección
		I.B.5. Puede explotar en el fuego	
II. GASES INFLAMABLES	II.A. Gases extremadamente inflamables		II.A. Gases o mezclas de gases que a 20 °C y presión de 101.3 kPa son inflamables en una mezcla al 13% o menos por volumen de aire
	II.B. Gases inflamables		II.B. Gases o mezclas de gases distintos a los de la Categoría 1.1. que bajo las mismas condiciones tienen un rango de inflamabilidad al mezclarse con el aire
III. AEROSOLIS INFLAMABLES	III.A. Aerosoles extremadamente inflamables		Diferenciados en base a sus componentes, calor químico de combustión y, en su caso, a los resultados de la prueba de espuma (para los aerosoles de espuma) y a una de las pruebas de inflamación a distancia y en espacio cerrado (para los aerosoles vaporizados)
	III.B. Aerosoles inflamables		
IV. GASES OXIDANTES	IV.1. Oxidante		Cualquier gas que liberando oxígeno pueda provocar o facilitar la combustión de otras sustancias en mayor medida que el aire
V. GASES A PRESIÓN	V.A. Gas Comprimido		Gas que envasado a presión es totalmente gaseoso a -50 °C y puede explotar si se calienta
	V.B. Gas Licuado	Alta Presión	Gas que envasado a alta presión es parcialmente líquido a T entre -50 y +65 °C y puede explotar si se calienta
		Baja Presión	Gas que envasado a baja presión es parcialmente líquido a T > +65 °C y puede explotar si se calienta
	V.C. Gas Licuado Refrigerado		Gas que envasado se encuentra parcialmente líquido a causa de su baja temperatura. Contiene gas refrigerado que puede provocar quemaduras o lesiones criogénicas

I.1. Aspectos Generales de los Plaguicidas.

	V.D. Gas Disuelto	Gas que envasado a presión se encuentra parcialmente en estado líquido y se disuelve en un disolvente en fase líquida. Puede explotar si se calienta
VI. LÍQUIDOS INFLAMABLES	VI.1. Líquido y vapor extremadamente inflamable	Punto de inflamación < 23°C y punto de ebullición ≤ 35°C
	VI.2. Líquido y vapor altamente inflamable	Punto de inflamación < 23°C y punto de ebullición > 35°C
	VI.3. Líquido y vapor inflamable	Punto de inflamación ≥ 23°C y punto de ebullición ≤ 60°C
	VI.4. Líquido combustible	Punto de inflamación >60°C y punto de ebullición ≤ 93°C
VII. SÓLIDOS INFLAMABLES	VII.1. Sólido inflamable peligroso	Sustancias y mezclas distintas de polvos metálicos con tiempos de combustión <45 s o polvos metálicos con tiempo de combustión es < 5 minutos
	VII.2. Sólido inflamable	Sustancias y mezclas distintas de polvos metálicos con tiempos de combustión <45 s o polvos metálicos con tiempo de combustión > 5 y ≤ 10 minutos
VIII. SUSTANCIAS AUTOREACTIVAS Y MEZCLAS	PELIGRO TIPO A.	Calentando podría producir una explosión
	PELIGRO TIPO B.	Calentando podría producir una explosión o un fuego
	PELIGRO TIPO C - D.	Calentando podría producir un fuego
	PRECAUCIÓN TIPO E - F.	Calentando podría producir un fuego
IX. COMPUESTOS PIROFÓRICOS	1. LÍQUIDOS	Sólidos o líquidos que se inflaman espontáneamente en contacto con el aire en 5 minutos
	2. SÓLIDOS	
X. SUSTANCIAS AUTOCALENTABLES Y MEZCLAS	1. PELIGROSO	Cuando da un resultado positivo tras un ensayo efectuado con una muestra de 25 mm a 140°C
	2. PRECAUCION	Cuando da un resultado positivo tras un ensayo efectuado con una muestra de 100 mm a 140°C y negativo con una muestra de 25 mm a 140°C
XI. SUSTANCIAS O MEZCLAS QUE EN CONTACTO CON EL AGUA EMITEN GASES INFLAMABLES	CATEGORÍA 1. PELIGROSO	En contacto con el agua desprende gases inflamables que pueden inflamarse espontáneamente
	CATEGORÍA 2. PELIGROSO	En contacto con el agua desprende gases inflamables con un régimen de emanación ≥ 20 l/kg/h
	CATEGORÍA 3. PRECAUCIÓN	En contacto con el agua desprende gases inflamables con un régimen de emanación ≥ 1 l/kg/h

1.1. Aspectos Generales de los Plaguicidas.

XII. LÍQUIDOS OXIDANTES	CATEGORÍA 1. FUERTE OXIDANTE	Puede producir fuego o explosión
	CATEGORÍA 2. PELIGROSO OXIDANTE	Puede intensificar un fuego
	CATEGORÍA 3. PRECAUCIÓN	Puede intensificar un fuego
XIII. SÓLIDOS OXIDANTES	CATEGORÍA 1. FUERTE OXIDANTE	Puede producir fuego o explosión
	CATEGORÍA 2. PELIGROSO OXIDANTE	Puede intensificar un fuego
	CATEGORÍA 3. PRECAUCIÓN	Puede intensificar un fuego
XIV. PERÓXIDOS ORGÁNICOS	PELIGRO TIPO A.	Calentando podría producir una explosión
	PELIGRO TIPO B.	Calentando podría producir una explosión o un fuego
	PELIGRO TIPO C - D.	Calentando podría producir un fuego
	PRECAUCIÓN TIPO E - F.	Calentando podría producir un fuego
XV. CORROSIVOS DE METALES	CATEGORÍA 1: PRECAUCIÓN	Velocidad de corrosión en superficies de acero o aluminio > 6.25 mm/año a temperatura de 55°C
XVI. TOXICIDAD AGUDA	CATEGORÍA 1: PELIGRO	Mortal por vía oral (LD ₅₀ ≤5 mg/kg peso), cutánea (LD ₅₀ ≤50 mg/kg peso) o inhalación bien en forma de gas (LD ₅₀ ≤100 ppm), vapor (LD ₅₀ ≤0.5 ppm), polvo o niebla (LD ₅₀ ≤0.05 ppm).
	CATEGORÍA 2: PELIGRO	Mortal por vía oral (LD ₅₀ 5-50mg/kg peso), cutánea (LD ₅₀ 50-200 mg/kg peso) o inhalación bien en forma de gas (LD ₅₀ 100-500ppm), vapor (LD ₅₀ 0.5-2.0ppm), polvo o niebla (LD ₅₀ 0.05-0.5 ppm).
	CATEGORÍA 3: PELIGRO	Tóxico por vía oral (LD ₅₀ 50-300mg/kg peso), cutánea (LD ₅₀ 200-1000mg/kg peso) o inhalación bien en forma de gas (LD ₅₀ 500-2500ppm), vapor (LD ₅₀ 2-10ppm), polvo o niebla (LD ₅₀ 0.5-1.0ppm)
	CATEGORÍA 4: PRECAUCIÓN	Perjudicial por vía oral (LD ₅₀ 0.3-2.0g/kg peso), cutánea (LD ₅₀ 1.0-2.0g/kg peso) o inhalación bien en forma de gas (LD ₅₀ 2500-20000ppm), vapor (LD ₅₀ 10-20ppm), polvo o niebla (LD ₅₀ 1-5ppm)
	CATEGORÍA 5: PRECAUCIÓN	Podría ser perjudicial por vía oral y cutánea (LD ₅₀ 0.2-5.0g/kg peso) o por inhalación bien en forma de gas, vapor, polvo o niebla.

I.1. Aspectos Generales de los Plaguicidas.

XVII. CORROSIVOS E IRRITANTES DE LA PIEL	CATEGORÍA 1: SUSTANCIAS CORROSIVAS	PELIGRO	Causa quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
	CATEGORÍA 2: SUSTANCIAS IRRITANTES	PRECAUCIÓN	Causa irritación de la piel
	CATEGORÍA 3: IRRITANTES MEDIOS	PRECAUCIÓN	Causa irritación media de la piel
XVIII. CAUSANTES DE PROBLEMAS OCULARES	CATEGORÍA 1: EFECTO IRREVERSIBLES	PELIGRO	Causa lesiones oculares graves
	CATEGORÍA 2: EFECTO REVERSIBLE	CAT. 2.A. IRRITANTES	Causa serias irritaciones oculares
		CAT 2.B. IRRITANTES MEDIOS	Causa irritación ocular
XIX. SENSIBLES A LA RESPIRACIÓN	TIPO 1A.	ALTA FRECUENCIA DE APARICIÓN EN HUMANOS	PELIGRO: si es inhalado puede provocar dificultad para respirar, reacciones asmáticas e incluso pueden ser los causantes de alergias respiratorias.
	TIPO 1B.	BAJA O MODERADA FRECUENCIA DE APARICIÓN EN HUMANOS	
XX. SENSIBILIZADOR DE LA PIEL	TIPO 1A. ALTA FRECUENCIA DE APARICIÓN EN HUMANOS		PRECAUCIÓN: pueden ser los causantes de reacciones alérgicas de la piel.
	TIPO 1B. BAJA O MODERADA FRECUENCIA DE APARICIÓN EN HUMANOS		
XXI. MUTAGÉNESIS EN CÉLULAS GERMINALES	CATEGORÍA 1: PELIGRO	Causantes de defectos genéticos	
	CATEGORÍA 2: PRECAUCIÓN	Sospechosos de ser los causantes de defectos genéticos.	
XXII. CARCINOGENÉTICOS	CATEGORÍA 1: PELIGRO	Causantes por exposición de cáncer	
	CATEGORÍA 2: PRECAUCIÓN	Sospechosos de ser los causantes de cáncer.	
XXIII. TÓXICOS PARA LA REPRODUCCIÓN	CATEGORÍA 1A: PELIGRO	Pueden ser causantes de daños en la fertilidad o en los fetos.	
	CATEGORÍA 1B: PRECAUCIÓN	Sospechosos de ser los causantes de daños en la fertilidad o en los fetos.	

I.1. Aspectos Generales de los Plaguicidas.

	CATEGORÍA 2: EFECTO SOBRE O A TRAVÉS DE LA LACTANCIA	Puede perjudicar a los lactantes
XXIV. TOXICIDAD DE ÓRGANOS TRAS UNA SOLA EXPOSICIÓN	CATEGORÍA 1: PELIGRO	Causan daño a órganos específicos
	CATEGORÍA 2: PRECAUCIÓN	Pueden causar daños a determinados órganos
	CATEGORÍA 3: PRECAUCIÓN	Puede causar irritación de las vías respiratorias o efectos narcóticos con somnolencia o mareos
XXV. TOXICIDAD DE ÓRGANOS TRAS EXPOSICIÓN REPETIDA	CATEGORÍA 1: PELIGRO	Causan daños a determinados a través de exposición repetida o prolongada
	CATEGORÍA 2: PRECAUCIÓN	Pueden causar daños a determinados a través de exposición repetida o prolongada
XXVI. PELIGRO DE ASPIRACIÓN	CATEGORÍA 1: PELIGRO	Puede ser mortal si se traga y entra en las vías respiratorias
	CATEGORÍA 2: PRECAUCIÓN	Puede ser nocivo si se traga y entra en las vías respiratorias
XXVII. TOXICIDAD AGUA PARA EL MEDIO ACUÁTICO	CATEGORÍA 1: PRECAUCIÓN	Muy tóxico para la vida acuática
	CATEGORÍA 2: PRECAUCIÓN	Tóxico para la vida acuática
	CATEGORÍA 3: PRECAUCIÓN	Nocivo para la vida acuática
XXVIII. PELIGROS A LARGO PLAZO PARA EL MEDIO ACUÁTICO	CATEGORÍA 1: PRECAUCIÓN	Muy tóxico para la vida acuática, con efectos nocivos duraderos
	CATEGORÍA 2: PRECAUCIÓN	Tóxico para la vida acuática, con efectos nocivos duraderos
	CATEGORÍA 3: PRECAUCIÓN	Nocivo para la vida acuática, con efectos nocivos duraderos
	CATEGORÍA 4: PRECAUCIÓN	Puede producir efectos perjudiciales a largo plazo para la vida acuática
XXIV. PELIGROSO PARA LA CAPA DE OZONO	CATEGORÍA 1: PRECAUCIÓN	Daños a la salud pública y el medio ambiente al destruir el ozono en la atmósfera superior

Tabla I.1.3. Resumen de las principales familias de herbicidas empleados en la actualidad. Depósito de documentos de la FAO. Departamento de Agricultura.

CLASE DE HERBICIDAS	MECANISMO DE ACCIÓN	FAMILIA QUÍMICA	HERBICIDAS	PROBLEMAS
Herbicidas que interfieren en la fotosíntesis	FS1, desviadores del fotosistema I	Compuestos bipiridílicos	Diquat Paraquat	Elevada toxicidad Prohibido su uso en diversos países
		FS2, inhibidores del fotosistema II	Triazinas	Atrazina; Simazina
	Ureas y Uracilos		Diuron; Linuron	Contaminación de aguas subterráneas
	Misceláneos de acción foliar	Bentazon; Bromoxynil	Elevada toxicidad para mamíferos	
Inhibidores de la biosíntesis de pigmentos	Inhibidores de la biosíntesis de clorofila	Difenil-éteres	Oxifluorfen Acifluorfen	Poca solubilidad en agua Requieren luz para su actividad
	Inhibidores de la biosíntesis de carotenoides	Varias familias	Amitrol Diflufenican	Causan decoloración de las partes aéreas nuevas del tallo emergente
Inhibición de la síntesis de lípidos	Ácidos grasos y ácidos grasos de cadena larga son necesarios en la formación de los componentes lipídicos de las membranas y ceras cuticulares	Derivados clorados de ácidos alcanoicos	Dalapon TCA	Fácil lixiviación
		Oximas	Tralkoxydim	Resistencia cruzada
		Ésteres de ácidos ariloxi-fenoxialcanoicos	Conocidos como "FOPS"	Resistencia cruzada
		Tiolcarbamatos	EPTC Butylate	Menor vida media al ser descompuestos por microorganismos del suelo.
Inhibición de la división celular	Interaccionan con los microtúbulos durante la mitosis	Cloroacetamidas	Alachlor Metolachlor	----
		Dinitroanilinas	Trifluralin	
		Carbamatos	Asulam	
Herbicidas que imitan al ácido indolacético	Desorganizan el crecimiento, actuando como si fuesen auxinas	Ácidos ariloxi-alcanoicos	MCPA; MCPB	Sus residuos permanecen por lo que no se suele usar como compostes
		Ácidos aril-carboxílicos	Terbutilazina	
		Ácidos Quinolino carboxílicos	Quinmerac	
Inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos	Aminoácidos aromáticos	Glicinas	Glifosato	Vulnerable al lavado por la lluvia
	Glutamina	Inhibidores de la glutamina sintetasa	Amoníaco Glufosinato Bialafos	Cultivos resistentes
	Aminoácidos de cadena ramificada	Sulfonilureas Imidazolinonas	Trisulfuron Imazapyr	Biotipos resistentes

I.1.2. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE PLAGUICIDAS.

I.1.2.1. Consumo de fitosanitarios a nivel mundial y europeo.

El consumo de productos fitosanitarios se ha mantenido relativamente estable en los últimos años, tanto a nivel nacional y europeo, como a nivel mundial.

El mercado europeo de ventas de fitosanitarios aumentó progresivamente entre los años 2000-2008, aunque experimentó un ligero descenso en la facturación en los últimos años debido a una importante reducción en las materias activas, es decir con disminución del consumo, reducción que se está compensando con productos de mayor valor añadido. No obstante, los datos reflejan que a partir del año 2011 se ha producido un nuevo aumento en el consumo lo cual se ha manifestado en un aumento de las ventas.

Por su parte, en el mercado mundial tanto las exportaciones como las importaciones de fitosanitarios se han disparado en los últimos años, aumentando el número de ventas hasta alcanzar cerca de 50.000 millones de euros en los dos últimos años reportados, lo que supone un aumento del 53%, tal y como refleja la **Figura I.1.1.**

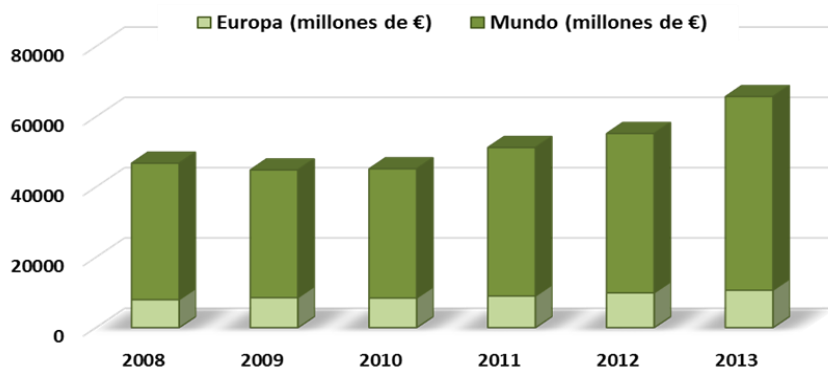


Figura I.1.1. Venta de fitosanitarios (exportaciones) en los mercados europeo y mundial durante los años 2008-2013 ^{12,13}.

I.1.2.2. Evolución del consumo de fitosanitarios a nivel nacional.

España es uno de los principales países consumidores de plaguicidas de la Unión Europea, y representa el 2% del total del comercio de fitosanitarios a nivel mundial con unas ventas totales en los últimos 5 años que oscilaron entre los 600-750 millones de euros, frente a una inversión en consumo que en el último año rozó también los 600 millones de euros, mostrando así claramente la importancia de su agricultura.

Según datos de la *Asociación Empresarial para la protección de las plantas (AEPLA)* ¹³ y la documentación facilitada a través del *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente* ¹⁴, la tendencia de los últimos años en el descenso en el consumo de fitosanitarios se habría visto interrumpida durante el ejercicio del 2011 con un aumento de aproximadamente el 50%, lo cual puede ser debido a las desfavorables

condiciones climatológicas advertidas en dicho periodo, mientras que el mercado se habría mantenido invariable hasta dicho periodo ^{12,13}, tal y como viene reflejado en la **Figura I.1.2**.



Figura I.1.2. Mercado de fitosanitarios a nivel nacional durante el período 2000-2013.

En cuanto a familias de productos, según la “Estadística sobre Comercialización de Productos Fitosanitarios” publicada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) ¹⁵ donde se recogen las cantidades de sustancias activas, por categoría de productos y clasificación química, contenidas en los productos fitosanitarios comercializados en nuestro país de un total de 600 millones de euros totales facturados en fitosanitarios durante el año 2012, correspondientes a un total de 62.769 Tm, cerca del 40% conciernen a fungicidas y bactericidas, como puede verse reflejado en la **Figura I.1.3**. Le seguirían en

importancia los molusquicidas y reguladores del crecimiento, con un 24%
13,16,17.

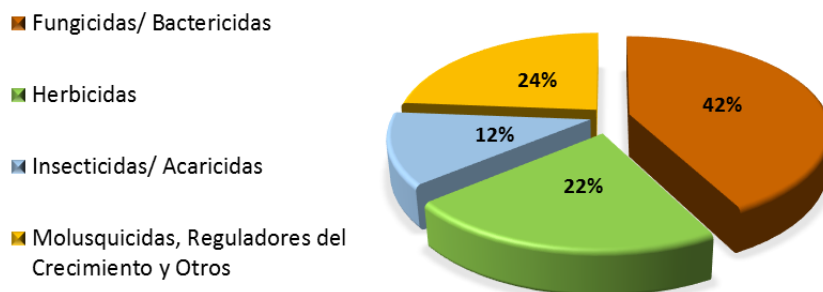


Figura I.1.3. Porcentajes de fitosanitarios por familias de productos comercializados en España en 2012. La clasificación ha sido realizada teniendo en cuenta los principales grupos según Anexo del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas.

Las ventas por Comunidades Autónomas a nivel español son bastantes diversas, en función del porcentaje de superficies dedicadas a la agricultura. Según la *Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos*¹⁸ realizada en colaboración con los *Servicios Estadísticos de las Comunidades Autónomas* publicada en el Anuario de *Estadística del Ministerio correspondiente al ejercicio del 2012*¹⁶, las comunidades autónomas que desarrollaron una agricultura más tecnificada y de mayor intensidad presentaron mayores consumos, siendo las de mayor empleo de productos fitosanitarios por hectárea Canarias, con 69,9 kg/ha, seguida de la Región de Murcia (23,5 kg/ha) y la Comunidad Valenciana (21,6 kg/ha), mientras que las comunidades que menor consumo registraron fueron

Castilla-La Mancha (1,9 kg/ha), Castilla y León (2,3 kg/ha) y Aragón (3,2 kg/ha).

La relación a nivel español entre comunidades autónomas y el consumo de plaguicidas en función de los kg por hectárea puede verse en la **Figura I.1.4.** mientras que el porcentaje del consumo total de pesticidas por Comunidad Autónoma queda reflejado en la **Figura I.1.5.**

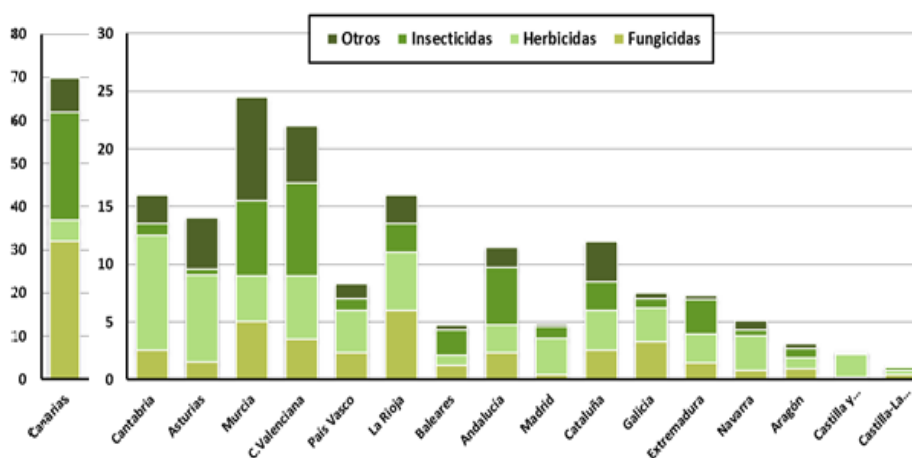


Figura I.1.4. Consumo de productos fitosanitarios (kg/ha) por Comunidades Autónomas según el Perfil Ambiental de España 2013 sección 2.9 editado por MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) referente al ejercicio del 2012 ¹⁹.

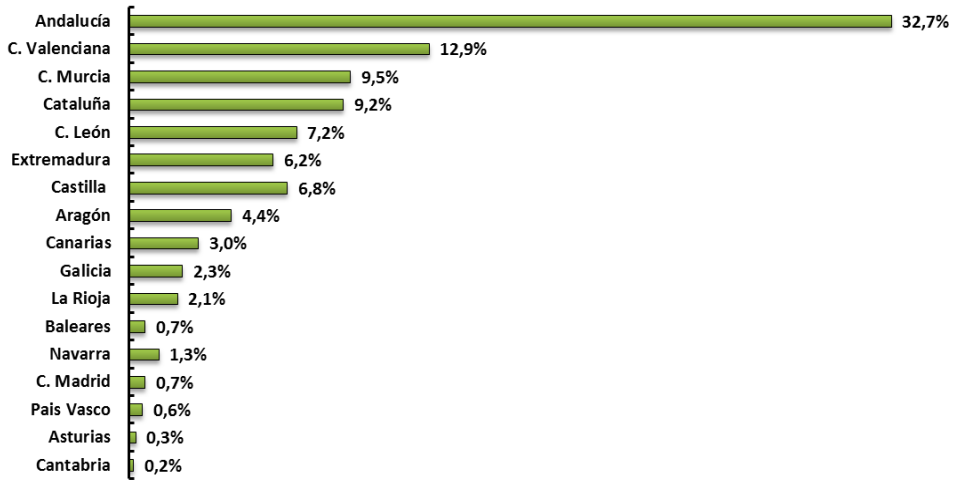


Figura I.1.5. Porcentaje del Consumo de Productos Fitosanitarios por Comunidades Autónomas según la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE) ¹⁸ y la Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (AEPLA) ¹².

I.1.3. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL Y LEGISLACIÓN.

I.1.3.1. Distribución de los pesticidas y su movilidad en el medio ambiente.

Uno de los principales problemas del uso de pesticidas es que no siempre permanecen en el lugar en el que se han utilizado originalmente. Por cuánto tiempo el pesticida permanece en el suelo depende de múltiples factores como la fuerza con la que queda vinculado por los componentes del suelo y la facilidad con que se degrada. También depende de las condiciones ambientales en el momento de la aplicación, por ejemplo, el contenido de agua del suelo ²⁰.

El uso de plaguicidas debe garantizar la seguridad pública y la protección del medio ambiente en lo que respecta tanto a la propia molécula como a sus metabolitos potencialmente dañinos, ya que a veces se trasladan a grandes distancias a través del agua, del suelo o del aire.

La contaminación puede ocurrir por medio de una serie de complejos procesos de transporte, volatilización, precipitación pluvial, escurrimientos, infiltraciones y lixiviaciones que vienen influidos por múltiples factores como las propiedades físico-químicas de la molécula, el mecanismo de transporte ambiental del plaguicida, las características medioambientales, físicas y condiciones climáticas del sitio de aplicación: topografía, tipo de suelo, ubicación, tipo de cubierta, precipitación anual, temperatura, etc ²¹.

El comportamiento de los pesticidas en el suelo viene influenciado por una gran variedad de complejos y dinámicos procesos químicos, físicos y biológicos entre los que destacan adsorción-desorción, volatilización, degradación físico-química, absorción por las plantas o los procesos de escorrentía y lixiviación. Todos estos procesos controlan el transporte del pesticida desde el suelo y su transferencia al agua, aire o a determinados alimentos. Así, parte del pesticida puede absorberse en la superficie de la planta, mientras que el resto se disuelve o se arrastra por el agua de lluvia hasta incorporarse al suelo y de éste, pasar a las aguas subterráneas. La facilidad con que se produzca este desplazamiento depende de las propiedades físico-químicas del pesticida en cuestión de modo que

aquéllos que sean poco solubles en agua, poco volátiles y químicamente estables, permanecen largos periodos de tiempo en el suelo. La cantidad de pesticida que se elimina por lixiviación depende de la retención del pesticida en el suelo, de su posible transformación química o biológica y de su volatilización.

La retención del pesticida en el suelo viene gobernada por el complejo proceso de adsorción, el cual aumenta con su contenido en materia orgánica. El movimiento de los pesticidas en el suelo puede ser a través de Difusión, Lixiviación (por efecto de la lluvia o el agua de riego), erosión (por medio del viento o del agua), Volatilización, asimilación por animales y microorganismos del suelo ²²⁻²⁶. Los principales factores que influyen en la persistencia de los pesticidas en el suelo son resumidos en la **Tabla I.1.4**.

En cuanto a la persistencia o acumulación de los pesticidas en el agua, el principal motivo son las malas prácticas agrícolas que han originado una merma en la calidad de las aguas tanto superficiales como subterráneas ²⁷⁻²⁹. Los pesticidas pueden presentarse en las aguas superficiales disueltos, en suspensión o en emulsiones que suelen formarse en presencia de tensoactivos. La movilización de los pesticidas en aguas superficiales como los ríos, lagos o arroyos permite el desplazamiento de estos compuestos hasta distancias considerables. Los procesos de acumulación pueden tener lugar cuando el contaminante transportado entra en los lagos, donde la corriente es menor, o presenta sedimentación de sólidos en suspensión ³⁰.

Tabla I.1.4. Principales factores que influyen en la persistencia de los pesticidas al suelo.

Pesticida	Suelo/Lugar	Clima
Naturaleza Química	Lugar	Viento
Volatilidad	- Localización	Temperatura, radiación solar
Solubilidad	- geográfica/pendiente	Precipitaciones, humedad relativa o evaporación.
Fórmula	- Cubierta vegetal	
Concentración	- Fauna	
Aplicación	- Poblaciones microbianas	
- Método	- Uso de fertilizantes	
- Fecha	- Uso de otros agroquímicos	
- Frecuencia	- Cultivo/labranza	
- Cantidad	- Presencia de contaminantes	
	- Quema de rastrojos	
	Suelo	
	- Contenido en arcillas y minerales	
	- Estructura y compactación	
	- Contenido en hummus	
	- Humedad	
	- Ph	

El destino de los pesticidas en la atmósfera es el más difundido, puesto que pueden desplazarse junto con las masas de aire, transformarse por medio de reacciones químicas, disolverse en el medio acuoso de las nubes, precipitar y retornar otra vez a la superficie terrestre ³¹. Además, en la atmósfera tienen lugar fenómenos meteorológicos y químicos que hacen incierto el comportamiento de los residuos vertidos. De este modo y gracias a la gran movilidad de los residuos en la atmósfera a través de fenómenos como la deriva, la pulverización, la volatilización y el transporte por el viento, pueden llegar a depositarse a centenas o incluso miles de kilómetros de distancia del lugar de su aplicación ³².

En resumen, la mayor parte de los plaguicidas, una vez aplicados, sufren procesos de degradación y transformación, total o parcial, que conducen a la formación de nuevos productos que, en ocasiones, pueden ser más móviles, persistentes y peligrosos que los compuestos de partida.

I.1.3.2. Efecto de los pesticidas en el hombre.

A pesar de que el empleo de los plaguicidas en los cultivos reporta significativas ventajas tanto en la producción como en la calidad, su uso abusivo por los agricultores ha llevado a que tanto en el suelo como en las aguas subterráneas queden depositados los plaguicidas o sus residuos, siendo este un problema de contaminación ambiental que también puede afectar a la salud humana. Por ello, antes de aplicar un determinado plaguicida contra una determinada plaga, hay que estudiar el entorno y elegir en consecuencia.

Como ya se ha indicado anteriormente, el consumo de pesticidas se está reduciendo en los últimos años en los países desarrollados, aunque se siguen aplicando de forma intensiva en los países tropicales. Se ha establecido que sólo un 0.1% de la cantidad de plaguicidas que son aplicados llega a la plaga, mientras que el restante circula por el medio ambiente, incorporándose a los cultivos y contaminando posiblemente el suelo, agua y la biota ^{33,34}. Por ser sustancias con capacidad para acumularse en la cadena alimentaria, especialmente en pescado, carne y productos lácteos, evaluar su verdadero impacto es prioritario.

Un análisis de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) determinaba, en 2007, que de la evaluación de un total de 236 sustancias, 144 podían tener un riesgo potencial en la salud ³⁵.

Diversos estudios en el ámbito internacional revelan problemas ambientales pero además la contaminación de determinadas zonas ha terminado por suponer un problema para la salud humana. En 1995, un estudio de mujeres embarazadas en Tailandia reveló que el 75% de ellas estaban contaminadas con pesticidas organoclorados y que a consecuencia de ello, los neonatos tenían niveles considerables DDT, Lindano, HCH y Heptacloro ³⁶. De la misma manera, un estudio realizado en México demostró que en jóvenes menores de 20 años de edad los niveles de contaminación con DDT eran altísimos, encontrándose entre 9 y 20 ppm ³⁷.

Teniendo en cuenta la ingente cantidad de ingredientes activos que anualmente son usados, su toxicidad aguda, subaguda y a largo plazo, la forma como se producen, transportan, almacenan y aplican, estas sustancias se han convertido en un problema de salud pública ³⁸. Cabe destacar que los niveles de mortalidad por intoxicaciones que se pueden presentar en una comunidad no son sólo el reflejo de una relación simple entre el agente y la persona expuesta, sino que reflejan además el efecto y la interacción de numerosos factores, tales como el tiempo de exposición, susceptibilidad de los individuos, estado nutricional de la población

afectada, condiciones de la exposición y factores educacionales, culturales, sociales y económicos ³⁹.

Entre los efectos que pueden causar toxicidad en humanos por exposición a plaguicidas, las más importantes son las afecciones debidas a compuestos organoclorados, que suponen un serio problema para la salud por acumulación ya que se absorben por la piel y los aparatos digestivo y respiratorio. Además, se ha comprobado que algunos insecticidas organoclorados inhiben la comunicación intercelular y actúan como promotores de tumores o incluso diabetes ⁴⁰⁻⁴³.

Otras afecciones importantes son debidas a compuestos organofosforados, o ésteres del ácido fosfórico que son muy tóxicos pero que se desarrollaron porque se descomponen con mayor facilidad que los clorados y a diferencia de ellos, no se acumulan en el organismo. En los últimos estudios se ha demostrado que inhiben la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas y que pueden desencadenar una mayor frecuencia de desórdenes neuronales y también leucemia linfocítica crónica en sujetos expuestos ⁴⁴⁻⁴⁶.

Otros pesticidas conocidos como piretroides sintéticos son utilizados ampliamente debido a su alta selectividad y potencia contra determinadas plagas así como por su rápida degradación por parte de los vertebrados, aunque si bien es cierto tras largas exposiciones a estos compuestos pueden ocasionar efectos neurotóxicos y alteraciones inmunológicas como

dermatitis y rinitis alérgica e incluso, convulsiones y edemas pulmonares a altas concentraciones ⁴⁷⁻⁴⁹.

En conjunto las afecciones más importantes que pueden desencadenar los plaguicidas por exposición prolongada pueden estar relacionadas con problemas para la reproducción, la fertilidad, el desarrollo embrionario y fetal, perturbaciones endocrinas, padecimientos neurológicos y problemas de comportamiento psíquico, enfermedades neurodegenerativas, cáncer e incluso, cáncer en neonatos o antes del nacimiento ^{50,51}.

Debido a todo esto, actualmente la UE valora la propuesta de reducir el número de pesticidas comercializados así como fomentar la agricultura con baja utilización de pesticidas, incluida la agricultura ecológica, mayor apoyo financiero comunitario a la investigación para fomentar el uso sostenible de pesticidas y el desarrollo de métodos y procedimientos integrados para la gestión de plagas ⁵².

I.1.3.3. Legislación actual sobre plaguicidas.

La Comisión del Codex Alimentarius ⁵³ es la estructura internacional, creada en 1963 desde la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), que controla y regula entre otras cuestiones la relacionada con la política internacional de la seguridad de los alimentos para proteger la salud de los consumidores.

Desde el año 2003, todos los estados miembros de la Unión Europea (UE) están adheridos a la Comisión del Codex Alimentarius, colaborando en el establecimiento de las normas de seguridad alimentaria que sirven de referencia al comercio de alimentos a nivel internacional. Si nos centramos en el uso de plaguicidas, el Codex Alimentarius como entidad reguladora fija unos criterios normativos relativos a los residuos de plaguicidas a nivel internacional. Se han definido una serie de conceptos, como el Límite Máximo de Residuos (LMR) y la Ingesta Diaria Admisible (IDA), con el objetivo de homogeneizar y así poder establecer criterios de control globales.

El Límite Máximo de Residuos (LMR) es la cantidad máxima de residuo de un producto fitosanitario específico (expresado en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de producto) que, por ley, se permite permanecer en los alimentos y en el forraje para animales. En la actualidad están fijados los LMR de casi la totalidad de los pesticidas para un gran número de alimentos, lo que sirve de referencia a los distintos países en sus legislaciones. De acuerdo con esto, se establecen las bases para eliminar los posibles riesgos en la salud humana derivados del exceso de pesticidas en los alimentos.

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) es la cantidad máxima diaria de producto químico que se puede ingerir durante la vida de una persona sin que suponga un riesgo apreciable para su salud. En base a ello, la Comisión Europea propuso armonizar en todos los estados miembros de la UE los

LMRs de productos fitosanitarios permitidos en alimentos de origen animal y vegetal.

En los últimos años, ha sido la Directiva 91/414/CEE sobre comercialización, utilización y control de los productos fitosanitarios en la UE la normativa más significativa, pues ha establecido los requisitos y procedimientos para la aprobación de sustancias activas, y las normas y criterios de autorización en cada estado miembro de los productos que las contienen. Como resultado, desde principio de los 90 se han eliminado muchas “sustancias antiguas”, se han incluido otras nuevas y tanto antiguas como nuevas se encuentran actualmente pendientes de revisión. El aspecto positivo de este proceso, es la realización de una exhaustiva evaluación de las sustancias y por tanto la constatación de su seguridad.

La aparición del Reglamento (CE) nº 396/2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo, es la legislación que regula las bases por las cuales se fijan los límites máximos de residuos de pesticidas. La entrada en vigor finalmente el 1 de septiembre de 2008 de su Anexo III, en el que se fijan los LMRs temporales, ha permitido la armonización total de la legislación sobre residuos de plaguicidas en los 28 Países Miembros de la Unión Europea. Este Anexo III viene a incluir los LMRs nacionales vigentes hasta esa fecha

que no estaban armonizados a nivel comunitario y que tienen el carácter de "temporales".

Pero sin duda la gran novedad en materia regulatoria para el sector en los últimos años ha sido la aprobación del nuevo marco legislativo comunitario en materia fitosanitaria aprobado en septiembre de 2009 [Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo y cuya entrada en vigor tuvo lugar a principios del 2010, y que está compuesto por el Reglamento de comercialización que sustituye a la Directiva 91/414 y la Directiva de Uso Sostenible cuyos objetivos pasan por garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana, animal y medioambiental, salvaguardar la competitividad de la agricultura comunitaria, proteger a los grupos vulnerables y armonizar las normas de libre circulación de productos. El sistema actual evalúa los productos considerando todos los posibles riesgos, es decir sólo se autorizan aquellos cuyo riesgo es aceptable.

El principal objetivo de la Directiva de Uso Sostenible es que los estados miembros desarrollen Planes Nacionales de Acción que, de acuerdo a sus especiales condiciones económicas, climatológicas y sociales, establecerán objetivos, medidas y plazos que fomenten un uso más sostenible de estos productos. En concreto, abarcarán aspectos como la formación de usuarios e información al público, la venta y almacenamiento,

la prohibición de pulverizaciones aéreas, la restricción de uso en zonas específicas, el mantenimiento de equipos de aplicación, la protección del medio acuático y el fomento de la Gestión Integrada de Plagas, cuyas técnicas de producción son de obligado cumplimiento desde 2014.

En el caso concreto de España, mediante el Reglamento (CE) nº 1107/2009, se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo, que anteriormente regulaban la comercialización de los productos fitosanitarios. En consecuencia también quedan derogadas las disposiciones nacionales adoptadas para la trasposición de los preceptos de dichas directivas y esto hace necesario que el presente real decreto incluya disposiciones relativas al cumplimiento de requisitos establecidos por dicho reglamento, en su artículo 67, que afectan a los comerciantes y usuarios de productos fitosanitarios.

I.1.4. MÉTODOS DE DETERMINACION DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS.

El análisis multiresiduo de los pesticidas es hoy en día un reto debido a los bajos niveles que presentan éstos en las muestras, así como a la amplia variedad y diferente familia química a la que pertenecen. Actualmente, se emplean más de 1000 pesticidas distintos, por lo que los laboratorios están bajo la presión constante de ensanchar la gama de pesticidas determinados en un mismo tiempo de análisis.

La determinación de los pesticidas en cantidades traza en matrices complejas como los alimentos frecuentemente requiere una extensiva

extracción de la muestra y preparaciones laboriosas en función de la metodología que se emplee en su determinación.

En general, la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos se solicita por dos motivos:

- ✓ para supervisar las buenas prácticas agrícolas (BPA), mediante la verificación del cumplimiento con las normas internacionales (Codex) o la legislación nacional, lo que garantiza que los LMR no se superen, y/o que los pesticidas no aprobados no sean utilizados,
- ✓ para proporcionar los datos de residuos que pueden ser utilizados para estimar ingestas dietéticas de los consumidores y para llevar a cabo, posteriormente, evaluaciones de riesgo.

El *Codex Alimentarius*⁵⁴ clasifica a los productos alimenticios en grupos y proporciona información sobre cómo preparar la muestra de laboratorio para el análisis. Dicho proceso analítico requiere las siguientes etapas:

- especificar la estabilidad del analito, es decir, que durante el procesado no se pierda parte de la carga de pesticidas en estudio
- homogenización de la muestra, para eliminar su posible heterogeneidad,
- extracción de los pesticidas de la matriz que los contiene,
- limpieza de los extractos de posibles interferentes co-extraídos con la matriz,

- determinación y cuantificación de los plaguicidas, por técnicas cromatográficas principalmente.

I.1.4.1. Métodos de extracción.

Los métodos tradicionales de extracción de pesticidas en matrices alimentarias emplean disolventes orgánicos, mezclas de ellos o bien mezclas con agua, en función de la naturaleza de la matriz y de los analitos a determinar. Según *S. L. Reynolds*⁵⁵ es importante que para la correcta extracción de los analitos, éstos estén perfectamente homogenizados con la matriz, y para ello, se pueden utilizar maceradores, trituradores y mezcladores del tipo *Ultraturrax*, sonicadores, etc., de manera que el analito quede en equilibrio con el disolvente y la matriz insoluble.

Existen muchas técnicas que han sido usadas tradicionalmente para aislar a los pesticidas de muestras de alimentos como la extracción con disolventes por agitación, la extracción por *Soxhlet* o la extracción con ultrasonidos⁵⁶⁻⁵⁹. Desafortunadamente, estas técnicas exigen el empleo de largos tiempos de extracción y grandes volúmenes de disolventes orgánicos, que pueden llegar a generar extractos que requieren una extensa limpieza antes del análisis.

Otras técnicas han intentado disminuir los tiempos de extracción y reducir el consumo de disolvente trabajando a elevadas temperaturas por encima del punto de ebullición del disolvente, de este modo el proceso de extracción se facilita debido a la desorción del analito de la matriz sólida.

Algunas de estas técnicas son la extracción asistida por microondas ⁶⁰ (*MAE*, microwave assisted extraction), extracción acelerada con disolvente o extracción por líquidos presurizados ⁶¹ (*ASE*, también conocida como *PFE* o *PLE*) o la extracción con fluidos supercríticos ⁶² (*SFE*, supercritical fluid extraction).

Aunque las posibilidades y métodos de extracción publicados han sido muchos en los últimos años, las técnicas más utilizadas han sido las extracciones sólido-líquido usando disolventes orgánicos que posteriormente requieren un procedimiento de purificación de los extractos. Las más conocidas son el Método *QuEChERS*, el método *MSPD* o la extracción en fase sólida (*SPE*, solid phase extraction).

1.1.4.1.1. Elección del Disolvente de extracción.

La *eficiencia* de la extracción depende de la polaridad de los analitos a extraer, de modo que cuando se pretende extraer pesticidas de naturaleza no polar (por ejemplo los pesticidas organoclorados), se suelen utilizar disolventes apolares como hexano, diclorometano, ciclohexano o acetato de etilo, entre otros, mientras que para pesticidas de naturaleza polar baja o media como los organofosforados se utilizan como disolventes de extracción polares como el acetonitrilo, el metanol, o mezclas de ellos con agua. La polaridad de un disolvente es reflejada en su constante dieléctrica, de modo que con valores altos, más polar será el disolvente ⁶³. Un resumen

de las características de los disolventes de extracción más comúnmente usados en la determinación de pesticidas se puede ver en la **Tabla I.1.5**.

Existen dos factores que afectan a la eficiencia de la extracción que son el pH y el uso de sales para eliminar el contenido acuoso de los extractos. El pH del disolvente de extracción puede ser extremadamente importante para un amplio número de pesticidas, ya que puede afectar a su disociación y solvatación, y en algunos casos, también a su estabilidad. Muchos pesticidas, en particular los ésteres, que se encuentran comúnmente como residuos en frutas y verduras, son sensibles al pH y se hidrolizan rápidamente a pH extremos, pudiendo generar otros compuestos a partir del compuesto principal, de modo que puede ser no detectado habiendo estado presente en la muestra ⁶⁴.

Tabla I.1.5. Propiedades físicas y tóxicas de los más importantes disolventes de extracción. (*) 25°C.

Disolvente	Nº CE ^a	CAS ^b	Constante Dieléctrica ^c (20°C)	Punto de Ebullición ^c (°C)	Presión de Vapor ^c (kPa at 25°C)	Punto de Inflamación ^c (°C)	Límite de Exposición a largo plazo ^d . VLA-ED ^e .	
							ppm	mg/m ³
Acetona	200-662-2	67-64-1	20.7*	56	30.8	-20	500	1210
Acetonitrilo	200-835-2	75-05-8	37.5	82	11.8	6	40	68
Ciclohexano	203-806-2	110-82-7	2.0	81	13.0	-20	200	700
Diclorometano	200-828-9	75-09-2	9.1	40	58.2		50	177
Ac. de Etilo	205-500-4	141-78-6	6.0*	77	12.6	-4	400	1460
Hexano	203-777-6	110-54-3	1.9	69	20.2	-22	20	72
Metanol	200-659-6	67-56-1	32.6*	65	16.9	11	200	266
Pentano	203-692-4	109-66-0	1.8	36	68.3	-40	1000	3000
Éter Petróleo	265-151-9	64742-49-0		30-60		-22 a -40		
Agua			78.5	100				

a. CE: El número CE es el número oficial de la sustancia en la Unión Europea.

b. CAS: Chemical Abstract Service (Servicio de Resúmenes Químicos).

c. [EH40/2002 Occupational Exposure Limits, HSE books, Sudbury, Suffolk, UK, ISBN 0-7176-2083-2, 2002].

d. Límites de exposición profesional para Agentes Químicos en España, 2013. VLA-ED^e (valor límite ambiental por exposición diaria) según Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Gobierno de España.

La eliminación de trazas de agua de los extractos también puede ser muy importante antes de la etapa de purificación y/o el análisis de cromatográfico. Las sales anhidras se utilizan como desecantes para eliminar el agua de los disolventes orgánicos mediante la formación de hidratos. Existen tres tipos de sales habitualmente utilizadas en la separación líquido-líquido: NaCl, Na₂SO₄ o MgSO₄. Sólo las dos últimas son eficaces, ya que ambas tienen capacidad para formar hidratos. Según *Lehotay et al* ⁶⁵ en un estudio comparando los tres tipos de sales en extractos de acetonitrilo, llegaron a la conclusión que el MgSO₄ era más eficaz que Na₂SO₄ para eliminar las trazas de agua que pudieran contener los extractos.

En la determinación de pesticidas en matrices alimentarias los disolventes de extracción más utilizados son la acetona, el acetonitrilo y el acetato de etilo. Acetona y acetonitrilo son completamente miscibles con el agua, mientras que el acetato de etilo presenta baja miscibilidad con el agua. Los extractos de acetonitrilo o acetona procedentes de frutas y verduras frescas extraen al mismo tiempo agua de la muestra. *Schneck y Lehotay* ⁶⁶ observaron que por lo general, es necesario eliminar esta agua antes de realizar cualquier determinación por cromatografía de gases, y esto se puede lograr mediante la partición de los pesticidas a partir del extracto acuoso/orgánico en un disolvente inmisible en agua.

El acetonitrilo en los últimos años ha sido el más utilizado de los tres, ya que aunque es más caro y tóxico que la acetona o el acetato de etilo, su

elevada polaridad hace que se extraigan menor número de compuestos lipofílicos como aceites, clorofilas, ceras, etc. Por su parte, la acetona fue muy utilizada en los años 70 por ser menos tóxica y más barata que los otros, sin embargo, su elevada volatilidad hizo que se planteara su uso para otro tipo de extracciones.

El acetato de etilo presenta la ventaja que con poca cantidad de agua que esté presente en la muestra puede ser fácilmente eliminada añadiendo sales anhidras sin necesidad de que para ello tenga lugar una extracción líquido-líquido adicional. Sin embargo, dada su baja polaridad y su inmiscibilidad en agua, su uso en matrices con alto contenido graso, como aceites, aguacates o productos animales es limitado, ya que coextrae otros materiales lipofílicos presentes en las muestras que pueden interferir en la correcta determinación de los analitos.

1.1.4.1.2. Tipos de extracción.

1.1.4.1.2.1. Extracción líquida a alta presión o PLE.

La Extracción líquida a alta presión o *PLE (Pressurized liquid extraction)* es una técnica de extracción que usa el calor para aumentar la temperatura del disolvente de extracción de modo que se acelere la cinética de extracción de los analitos empleando un menor volumen de disolvente. Para ello, se debe aplicar una mayor presión y esto generalmente se realiza acoplado una bomba, de modo que se garantice que el disolvente no entra en fase de vapor. Los parámetros más importantes a tener en cuenta

por lo tanto, serán el tipo de muestra, el tipo de disolvente (propiedades como la miscibilidad o la polaridad), la temperatura (el aumento de la temperatura genera una mayor solubilidad de los analitos lo que mejora su más fácil desorción de la matriz aunque también pueden degradar a otros analitos presentes en la muestra), el tiempo de extracción, el número de ciclos de extracción (el número de ciclos variará en función de la temperatura) y la presión (varía en función del tipo de disolvente y la presión escogida será la que lo mantenga en estado líquido).

Aunque se trata de una técnica que se ha empleado en la determinación de residuos de pesticidas en piensos ⁶⁷, pescados ⁶⁸ y frutas ^{69,70} dando buenos resultados en términos de recuperación y bajos *RSDs*, existen diversos factores que han impedido esta técnica se establezca como los altos costes de inversión o el uso de elevadas temperaturas en los instrumentos de análisis.

1.1.4.1.2.2. Extracción por Fluidos Supercríticos o SFE.

La Extracción por Fluidos Supercríticos o *SFE* (*Supercritical Fluid Extraction*) es una alternativa a los procedimientos tradicionales de extracción de pesticidas que emplea como disolvente de extracción un fluido en estado supercrítico. El CO₂ ha sido el que mejores resultados ha dado hasta la fecha por sus características supercríticas a 31°C y 73 bar, ya que no es tóxico, es bastante inerte, fácil de evaporar a temperatura ambiente y es relativamente económico.

Este método comparado con otras técnicas de extracción es más fácil de automatizar, requiere menor consumo de disolventes peligrosos, genera menos residuos y además necesita menor preparación de la muestra. El CO₂ al ser un gas puede eliminarse fácilmente tras la extracción dejando los analitos atrapados en un material adsorbente o disueltos en un pequeño volumen de un disolvente orgánico. Para que una sustancia sea considerada supercrítica, debe ser calentada y presurizada por encima de sus valores de presión y temperatura críticos, lo que genera un estado entre gas-líquido que le confiere unas propiedades hidrodinámicas que permiten una mejor difusión de los analitos que empleando disolvente líquidos. Todo ello hace que sea una técnica más sensible y rápida en la extracción de los analitos.

No obstante, dadas las propiedades particulares a las que se utiliza el extractante hace que este método no sea sencillo, debido a los innumerables factores a controlar durante el proceso, entre ellos destaca el control de la presión, la temperatura, la densidad, la adición de modificadores, el control del agua y el “*salting-out*”, el tiempo, etc. Sin embargo, ha sido empleada en numerosas determinaciones de pesticidas en todo tipo de matrices ⁷¹⁻⁷³, sobretodo en frutas y verduras ⁷⁴, cereales ^{75,76} e incluso aceite de oliva ⁷⁷.

A pesar de las grandes ventajas que ofrece esta técnica como la selectividad o la posibilidad de automatización, su interés ha disminuido en

los últimos años, debido principalmente al alto coste de la instrumentación, el consumo de tiempo y la complejidad en su aplicación rutinaria.

I.1.4.1.2.3. Extracción asistida por Microondas o MAE.

La Extracción asistida por Microondas o *MAE* (*Microwave-assisted extraction*) es un tipo de extracción que utiliza el calor generado por la energía microondas para acelerar las extracciones. Este procedimiento consiste en el calentamiento del extractante (en general un disolvente orgánico) en contacto con la muestra, haciendo uso de la energía de microondas donde el reparto del analito de interés desde la muestra hasta el extractante va a depender de la temperatura y de la naturaleza del extractante.

Cabe notar que, al contrario de lo que sucede en un calentamiento convencional, las microondas calientan la muestra sin necesidad de calentar el vaso reactor, por lo que es posible alcanzar con rapidez el punto de ebullición, disminuyendo el tiempo de extracción.

Las principales ventajas de la *MAE* radican en que los tiempos de extracción son cortos, en torno a los 30 min, y que además utiliza pequeños volúmenes de disolventes orgánicos.

Para la optimización de las condiciones de extracción, los parámetros más comúnmente estudiados son la composición y volumen del disolvente,

la temperatura, la presión (en vasos cerrados), la potencia de microondas, el tiempo de extracción y las características de la matriz.

Las aplicaciones de *MAE* se centran fundamentalmente en la extracción de compuestos orgánicos de matrices sólidas. Sin embargo, aunque las primeras aplicaciones estuvieron relacionadas con la determinación de HAPs y PCBs en suelos y sedimentos, otros compuestos tales como pesticidas han sido extraídos con eficacia en diferentes matrices como en frutas y verduras ^{78,79}, o incluso en matrices grasas como el aguacate o el aceite de oliva ^{80,81}.

Por otra parte, aunque los resultados evidencian que la *MAE* puede competir favorablemente con otras técnicas como la extracción con fluidos supercríticos, la selectividad alcanzada es menor, y generalmente requiere de un proceso adicional de purificación antes del análisis cromatográfico. Además, su empleo en sistemas abiertos genera pérdidas de analitos volátiles y termolábiles lo que ha generado que este procedimiento no haya sido el más atractivo para la determinación de pesticidas en matrices alimentarias.

1.1.4.1.2.4. Extracción asistida por sonicación o USE.

La extracción asistida por ultrasonidos o *USE* (*Ultrasonication/Sonication-assisted extraction*) o utiliza los ultrasonidos para la transmisión de las ondas de sonido a través de un medio funcionando como ondas de presión, lo que conlleva un aumento de la movilidad de las moléculas

implicadas en dicho medio y por lo tanto, su desprendimiento de la matriz que los contiene.

Los ultrasonidos ejercen su efecto a través de lo que se conoce como burbujas de cavitación. Éstas se forman en el ciclo de depresión de la onda, cuando la estructura del líquido literalmente se abre, por la presión negativa, para formar burbujas microscópicas. En el siguiente ciclo de compresión, las burbujas se ven obligadas a contraerse y, en consecuencia, se rompen. Esta ruptura de las burbujas de cavitación puede generar presiones de cientos de atmósferas y temperaturas de miles de grados centígrados en micropuntos del medio, dando lugar a ondas de choque que se dispersan por el medio de reacción.

En los últimos años se han descrito muchas aplicaciones de este procedimiento en diferentes matrices alimentarias para la extracción de pesticidas obteniendo excelentes resultados. Entre ellas, podemos destacar la determinación de pesticidas en miel ⁸², leche ⁸³, frutas, cereales y verduras ^{84,85}.

1.1.4.1.2.5. Otros procedimientos de extracción basados en técnicas de adsorción.

Las técnicas de adsorción se basan en la separación de los analitos de interés de entre una fase sólida o gas y la superficie de un adsorbente. Los adsorbentes generalmente son materiales porosos con una gran superficie de área que contiene grupos activos con los que los analitos interaccionan.

La adsorción del analito en la superficie del adsorbente viene seguida de una desorción generalmente usando una pequeña cantidad de un disolvente. Eligiendo el material adsorbente, las condiciones de anclaje de los analitos en el adsorbente así como las condiciones y tipo de elución, se puede condicionar los rendimientos y la selectividad del proceso.

Existen varios tipos de adsorbentes con diferente estabilidad térmica y química:

- *adsorbentes inorgánicos basados en el carbono*, como el carbón grafitizado con elevada afinidad por los compuestos orgánicos y que no se altera hasta los 450°C,
- *adsorbentes basados en óxidos metálicos*, como sílica o alumina que tienen afinidad hacia la retención de compuestos polares y que son térmicamente estables a 400-600°C,
- *geles de sílice modificados (enlazados)*, generalmente usados para desorción líquida,
- *adsorbentes poliméricos*, etc.

Las técnicas de separación por adsorción a menudo han sido empleadas en la preparación de muestras con varios propósitos analíticos, tales como la eliminación selectiva de los componentes interferentes de la matriz (*clean-up*), la fortificación de analitos, el intercambio de disolventes (de acuoso a orgánico) y el almacenamiento y transporte de los extractos de las muestras.

De entre las diferentes técnicas de extracción por adsorción, la más conocida es la Extracción en Fase Sólida o *SPE (solid-phase extraction)*. Este procedimiento incluye un adsorbente sólido y una fase líquida. Esta técnica ha sido utilizada para extraer, concentrar y purificar analitos en muestras líquidas. Generalmente, los adsorbentes van empaquetados en columnas o cartuchos. Así, la *SPE* constituye una especie de sistema cromatográfico en el que al inicio la muestra líquida o el extracto de la muestra es filtrada a través del lecho del adsorbente que está en el interior de la columna. Este proceso continúa con una elución fraccional de varios componentes usando pequeños volúmenes de disolvente.

Existe una amplia variedad de adsorbentes con varios tipos de sitios activos en superficie en los que los analitos y los componentes de la matriz pueden interactuar más o menos fuerte o selectivamente. Además, se debe conocer la afinidad de los analitos tanto con la fase móvil como con la fase estacionaria.

En general, la *SPE* ha sido más fácilmente aceptada por los analistas que trabajan en los campos biomédico y farmacéutico, donde los analitos son predominantemente de naturaleza polar y por lo tanto analizados por *HPLC*. Además, esta técnica ha sido rápidamente adoptada en el análisis de aguas debido a sus numerosas ventajas como el ahorro de disolvente, la automatización y las posibilidades de toma de muestras *in situ*.

El procedimiento típico de la *SPE* puede verse resumido en una serie de etapas que pueden verse gráficamente en la **Figura I.1.6.**

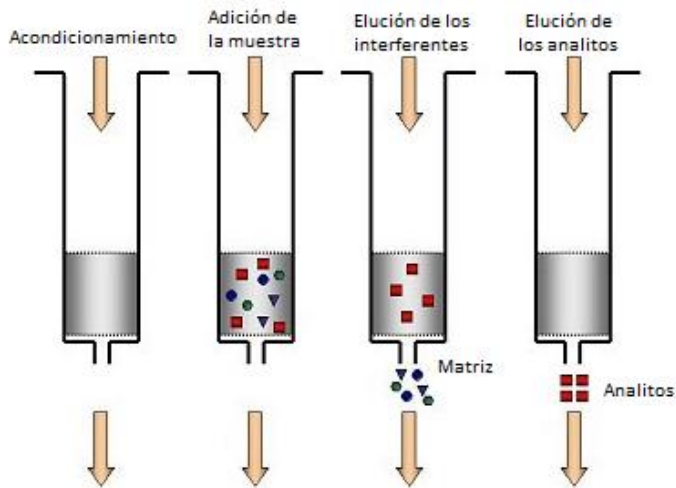


Figura I.1.6. Secuencia de pasos general para un procedimiento SPE o de extracción en fase sólida.

Las principales etapas son:

- *Acondicionamiento* de la columna y equilibrado,
- *Carga de la muestra* (retención) en la columna donde los componentes de la matriz junto con los analitos de interés son retenidos entre el material adsorbente.
- *Elución de los interferentes*, disolventes adecuados son pasados a través de la columna para eluir los componentes de la matriz mientras dejan los analitos retenidos en el material adsorbente,

- *Secado*, en determinadas aplicaciones donde el analito o los disolventes empleados son inmiscibles en el disolvente de elución,
- *Elución de los analitos de interés* mediante el paso de un disolvente apropiado.

Las ventajas de esta técnica tanto para extraer analitos de una matriz como para purificar los extractos hacen que sea de práctica habitual en muchísimos laboratorios y en gran cantidad de diferentes procedimientos para aislar todo tipo de analitos. Sin embargo, como toda técnica tiene algunos inconvenientes como la posibilidad de introducir interferentes, factores asociados a la reproducibilidad en las etapas de secado y elución o la influencia de la matriz en la extracción debido a posibles fenómenos de competencia.

Por último, cabe destacar que la *SPE* ha sido acoplada a otro tipo de materiales de adsorción como los anticuerpos para crear lo que se conoce como *SPE-ISs*⁸⁶ (*SPE with immunosorbents ISs*) en donde la interacción inmunoquímica antígeno-anticuerpo ha sido la clave en el procedimiento o bien también ha sido acopladas junto a polímeros sintéticos *MISPE*⁸⁷ (*SPE with molecular-imprinted polymers*) que poseen sitios de reconocimiento molecular que son complementarios a los sitios tridimensionales y se posicionan en los lugar de anclaje de los grupos funcionales de los analitos.

Este tipo de técnicas todavía hoy se están investigando para el análisis de pesticidas en muestras de alimentos, aunque teniendo en cuenta la

tendencia actual en el análisis multiresiduo será difícil su inclusión en los laboratorios de rutina debido al elevado coste de generación de anticuerpos o de polímeros sintéticos específicos para un determinado analito.

1.1.4.1.2.6. Microextracción en Fase Sólida o SPME.

La Microextracción en Fase Sólida o *SPME* (*Solid-phase MicroExtraction*) es una técnica de extracción relativamente reciente, desarrollada por *Pawliszyn et al.*⁸⁸ representa un valioso avance en uno de los pasos fundamentales del proceso analítico, como es la preparación de muestras. Se basa en el equilibrio de reparto de los analitos, entre una fase polimérica estacionaria que recubre una fibra de sílice fundida y la matriz de la muestra.

La puesta en práctica de la *SPME* comprende dos pasos. En primer lugar, los analitos son extraídos desde la matriz que los contiene por contacto de la muestra con una fibra recubierta de una fase activa y a continuación, la fibra se separa de la muestra y los analitos retenidos en la misma son entonces desorbidos (habitualmente por desorción térmica) en un instrumento analítico, generalmente un sistema cromatográfico GC, en el que se someten a procesos de separación y determinación cualitativa y/o cuantitativa. También puede realizarse en un sistema de HPLC, introduciendo la fibra en una interfase *SPME-HPLC*.

Con el uso de la microextracción en fase sólida se pueden realizar tres tipos diferentes de muestreo ⁸⁹:

- *Extracción Directa*, que se caracteriza por la inmersión de la fibra directamente en la muestra líquida o gaseosa. Suele aplicarse al análisis de muestras relativamente limpias,
- *Extracción en Espacio en Cabeza o Head Space (HS-SPME)*, en la que la fibra se suspende en el espacio gaseoso en contacto con la muestra. Es una técnica adecuada para muestras líquidas sucias e, incluso, para muestras sólidas.
- *Extracción con fibras protegidas con membranas*, que es una variante de la extracción directa en la que la fibra, o mejor, el recubrimiento de la fibra, se protege frente a posibles daños. Es especialmente adecuada para la extracción de analitos en muestras muy contaminadas.

La *SPME* presenta importantes ventajas con respecto a las técnicas convencionales, entre ellas podemos destacar que no requiere disolventes orgánicos (generalmente caros y con frecuencia peligrosos), la técnica es muy simple, rápida, de fácil automatización, portátil y económica, que sólo se requiere un pequeño volumen de muestra y que además, puede acoplarse fácilmente a la Cromatografía de Gases (GC) ^{90,91}, con algunas modificaciones a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) ⁹², y recientemente a la Electroforesis Capilar (CE) ⁹³.

La aplicación de esta técnica en diferentes matrices alimentarias para el análisis de pesticidas ha sido ampliamente documentada. Entre las investigaciones más frecuentes se encuentran la determinación de pesticidas en frutas y verduras^{90,94,95}, miel⁹⁶, leche^{97,98}, vino⁹⁹ y aceite de oliva¹⁰⁰⁻¹⁰².

Las principales desventajas de la *SPME* incluyen la pobre reproducibilidad, precisión y robustez en las determinaciones. Además, la técnica se limita a compuestos relativamente volátiles, y se produce efecto matriz en matrices complejas.

I.1.4.2. Métodos de purificación.

Tras la etapa de extracción no sólo quedan aislados los analitos, sino que hay diferentes tipos de compuestos de interferencia en matrices alimentarias que son co-extraídos como las grasas, los hidratos de carbono, el agua, clorofilas y otros. Así, para realizar una buena determinación y cuantificación de los pesticidas presentes en una muestra alimentaria, es imprescindible que los extractos estén libres de interferentes.

La purificación, limpieza o *clean-up*, es el proceso mediante el cual los extractos procedentes de una determinada matriz son desprovistos de los posibles compuestos distintos de los analitos en estudio que son co-extraídos y que dificultan la correcta determinación de los primeros, evitando la introducción de interferencias y minimizando el riesgo de deterioro de los extractos y los instrumentos de análisis.

Los métodos de purificación de los extractos procedentes de una matriz alimentaria que contiene residuos de pesticidas varían en la forma en la que se extraen los pesticidas de la matriz y en el tipo y la naturaleza del ingrediente activo que se ha utilizado.

Existen muchos métodos diferentes de purificación, pero en materia agroalimentaria los más utilizados son:

- ✓ extracción líquido-líquido (*LLE*), la separación líquido-líquido entre hexano y acetonitrilo es uno de los métodos más antiguos para la separación de pesticidas de grasas biológicas y ceras. Usando una adecuada proporción de estos disolventes, los pesticidas se distribuyen en el acetonitrilo mientras que los lípidos quedan en la fase hexánica^{103,104}. El problema que presenta esta técnica es que no se obtienen los niveles de purificación necesarios para los actuales métodos de análisis que requieren cuantificación a niveles traza;
- ✓ extracción en fase sólida (*SPE*), es el método de purificación más comúnmente utilizado. Es una potente y simple técnica de limpieza de muestras y preconcentración que, al mismo tiempo, es rápida y económica (ver apartado *1.1.4.1.2.5*). Consiste en la aplicación de la cromatografía de adsorción usando diferentes tipos de adsorbentes como alúmina, gel de sílice y Florisil, solos o en combinación, pero no siempre puede garantizar que los extractos queden libres de interferentes. La adición de un eluyente permite eliminar los componentes de la matriz que interfieren. Con fases hidrofóbicas

(generalmente C_{18}) se usa un solvente polar, como el metanol. Con fases estacionarias polares (por ejemplo, sílice) se usa un solvente no polar, como el cloruro de metileno. Después se eluyen los analitos de interés. Este método ha sido aplicado con éxito para el análisis de contaminantes en diferentes matrices alimentarias, como la determinación de *PCBs* en aceite de pescado ¹⁰⁵, determinación de pesticidas organoclorados en semillas de sésamo ¹⁰⁶ o herbicidas en patatas ¹⁰⁷.

- ✓ cromatografía de permeación en gel (*GPC*), también conocida como *cromatografía de exclusión por tamaño*, se basa en la separación de moléculas de acuerdo a su tamaño, según su capacidad para atravesar el entramado de geles que constituyen la fase estacionaria (largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa), manteniendo por tanto, un orden de elución (***Figura I.1.7.***). Muchos pesticidas tienen pequeños pesos moleculares en comparación con los compuestos que son co-extraídos tales como clorofilas, carotenoides, ceras, triglicéridos, etc, y por tanto, la separación puede lograrse fácilmente.

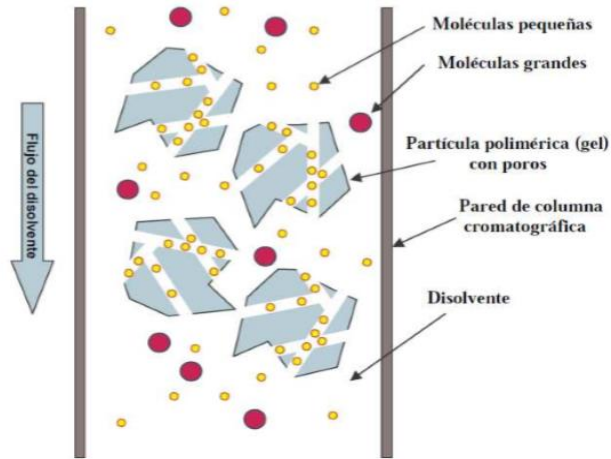


Figura 1.1.7. Esquema representativo de una sección de una columna de GPC mostrando como tendría lugar la elución en función del tamaño.

Las partículas de gran tamaño solo pueden recorrer el espacio intersticial entre las partículas de la fase estacionaria y penetran en los poros del gel con menor eficacia que las moléculas más pequeñas y por lo tanto viajan más rápidamente a través de la columna. Las de tamaño intermedio pueden penetrar en los poros de mayor diámetro de los gránulos de relleno, y los más pequeños pueden viajar a lo largo de la columna por el volumen intersticial y por los canales, grandes o pequeños, del interior de las partículas de fase estacionaria. Los compuestos son eluidos de mayor a menor peso molecular. Estas primeras fracciones de eluato son descartadas, mientras que más tarde son recogidas las fracciones que contienen los pesticidas. Generalmente, la fracción de elución última contiene moléculas muy

pequeñas y también se descarta. Por lo tanto, la *GPC* se recomienda en la purificación de los extractos obtenidos a partir de muestras biológicas, y además puede ser utilizada para la separación de moléculas de gran tamaño (por ejemplo, lípidos).

A diferencia de las técnicas de limpieza basadas en *SPE*, las diferencias en la polaridad entre los pesticidas, tienen poco o ningún efecto en sus tiempos de retención en la columna de *GPC*, por lo que una amplia gama de analitos puede ser recogida en una única fracción, sin la necesidad de ajustar la polaridad de la columna. Esta técnica actualmente está automatizada mediante la conexión de una bomba y un auto-inyector a la columna y la adición de un colector de fracciones.

Este método puede ser empleado para la purificación de extractos de muchos pesticidas y *PCBs*, dando lugar a extractos listos para su posterior análisis mediante cromatografía de gases o líquidos con un detector adecuado. Debido a sus propiedades, esta metodología es altamente efectiva en lo que se refiere a la eliminación de grasas y aceites, como en los extractos de aceite de oliva y aceitunas¹⁰⁸⁻¹¹⁰, de aguacate¹¹¹ o en aves de corral, carne de cerdo y carne de cordero¹¹².

I.1.4.3. Métodos cromatográficos de determinación de pesticidas en alimentos.

Generalmente, la separación, identificación y cuantificación de los pesticidas han sido llevadas a cabo por cromatografía de gases (*GC*)

acoplada a diferentes detectores, dado el carácter volátil de estos, aunque recientemente, la aplicación de nuevos pesticidas de naturaleza polar hace que se estén analizando por cromatografía líquida en fase reversa. Ambos tipos de cromatografía han sido acoplados a distintos tipos de detectores para el análisis de residuos de plaguicidas en diferentes matrices alimentarias respondiendo así a la creciente demanda de métodos multiresiduo capaces de dar cuantificaciones fiables a niveles traza. Entre ellos podemos citar:

- ✓ *FID*, detector de ionización a la llama ¹¹³,
- ✓ *NPD*, detector de nitrógeno-fósforo ^{79,102},
- ✓ *ECD*, detector electroquímico ¹¹⁴,
- ✓ *MS*, detección por espectrometría de masas ¹¹⁵, con analizador de tiempo de vuelo-masas o *TOF* ^{116,117}, con trampa de iones ¹¹⁸ o con el *QTrap* que es un híbrido entre triple cuadrupolo y trampa de iones que incorpora un sistema de aceleración de iones a través del cuadrupolo llamado *LINAC*, cuya ventaja es disminuir el “*dwell time*” sin perder sensibilidad en la determinación ¹¹⁰.

1.1.4.3.1. Determinación de plaguicidas en alimentos por GC-MS.

En las últimas décadas, los procedimientos de análisis para más de 400 pesticidas termoestables en muestras de alimentos han sido basados en determinaciones por cromatografía de gases. Los resultados obtenidos con los populares detectores selectivos tales como *ECD*, *NPD*, *FPD* ofrecen

elevada selectividad pero no ofrecen información completa de la identificación, y por ello, hoy en día se requiere la confirmación por GC-MS.

Esta técnica se ha beneficiado de la evolución de las columnas capilares de sílice fundida y el desarrollo de los espectrómetros de masas relativamente pequeños y de bajo costo que en la actualidad se están comercializando para su acoplamiento directo con el cromatógrafo de gases.

Gracias a la elevada sensibilidad y selectividad de los nuevos instrumentos de GC-MS se han llegado a conseguir bajos niveles de detección de pesticidas, pudiendo alcanzar el nivel de nanogramos, con la aplicación de una etapa de purificación de los extractos.

Los analistas de residuos de plaguicidas han intentado durante mucho tiempo crear nuevos métodos de identificación más selectivos y específicos en los que se redujese el tiempo y las laboriosas etapas de limpieza de los extractos. *Yost & Enke*¹¹⁹ en 1978 publicaron el acoplamiento del tándem GC-MS/MS, en el que se utilizaban dos analizadores de masas de cuadrupolo en línea en combinación con un cromatógrafo de gases proporcionando una nueva perspectiva para el logro de este objetivo.

Las primeras aplicaciones de la GC-MS/MS en el análisis de alimentos demostraron las enormes posibilidades de ésta técnica pero fueron más académicas que prácticas, ya que en el trabajo de rutina la sensibilidad de

la detección y el rendimiento disminuían rápidamente con el aumento de los depósitos de matriz en la fuente de iones.

La introducción de la muestra directa requiere de una técnica de detección muy selectiva para determinar los analitos de interés entre los muchos componentes de la matriz. Así, la GC-MS/MS se utiliza con frecuencia para las muestras de alimentos cuyos cromatogramas muestran una superposición de ciertos pesticidas con compuestos de matriz tales como ácidos grasos libres que permanecen en los extractos aún tras una etapa de limpieza. Es por ello, que la determinación de estos pesticidas requiere de una mayor selectividad aplicando técnicas acopladas como GC-MS/MS con los analizadores de trampa de iones (*Ion Trap o IT*)^{118,120} o GC-TOF-MS con el analizador por tiempo de vuelo (*time of flight o TOF*) junto con el de cuadrupolo TOF-MS^{121,122}.

1.1.4.3.2. Determinación de plaguicidas en alimentos por LC-MS.

Muchos pesticidas volátiles y polares pueden ser determinados eficientemente por métodos de GC usando diferentes sistemas de detección como FID, ECD y MS en modo impacto electrónico o por ionización química. Sin embargo, los pesticidas polares, térmicamente lábiles y con baja volatilidad como carbamatos y triazinas, sus metabolitos y productos de degradación no pueden ser analizados correctamente a través de GC, y en estos casos, la derivatización química no ayuda mucho a la determinación, así que en general, se suelen analizar por HPLC sin

necesidad de una derivatización. Sin embargo, los tradicionales detectores que utilizan los cromatógrafos de líquidos como el ultravioleta o el DAD (diode array detector), no son suficientemente sensibles y selectivos para analizar los pesticidas presentes en matrices alimentarias complejas ¹²³.

Otros detectores algo más selectivos como el de fluorescencia o electroquímico solo pueden aplicarse cuando el pesticida o sus derivados cumplen determinados requisitos ^{124,125}. Este es el caso de procedimientos que utilizan la derivatización y consiguen alcanzar bajos límites de detección ^{126,127}.

Los estrictos límites de detección que son requeridos para la cuantificación de residuos de pesticidas en muestras de alimentos y medioambientales, requieren el uso de tecnologías muy sensibles, selectivas, robustas y precisas. La aplicación de LC-MS es la mejor alternativa ¹²⁷ para aquellos compuestos muy polares o térmicamente inestables como por ejemplo el amitrol, mientras que los térmicamente estables o bien relativamente volátiles, se suelen analizar por GC-MS ¹²⁸.

El acoplamiento de la LC con la espectrometría de masas se ha convertido en una técnica cada vez más empleada en la determinación de pesticidas en alimentos de forma rutinaria. Ofrece algunas ventajas frente a otros detectores, entre ellas que ofrece información más específica, mayor sensibilidad para compuestos no volátiles o semivolátiles y porque además puede utilizarse con fines cuantitativos.

Varios tipos de columnas han sido utilizadas para la separación de los pesticidas en el análisis de alimentos, aunque generalmente ha sido utilizadas columnas en fase reversa con relleno de C_{18} , si bien es cierto, algunos trabajos en el pasado utilizaron columnas de C_8 para determinación de carbamatos en carnes^{129,130} o incluso más recientemente en cereales y grano¹³¹.

El acoplamiento entre la LC y la MS fue muy lento en comparación al desarrollo del GC-MS, debido a los problemas técnicos que se derivan de la introducción de líquidos en un espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Para que el acoplamiento LC-MS pudiera ser efectivo, fueron ideadas varios tipos de interfases aunque en la actualidad la más desarrollada ha sido la de ionización a presión atmosférica (API), con dos tipos principales de fuentes de ionización, por electrospray (ESI) y por ionización química a presión atmosférica (APCI) que han mejorado la viabilidad de la identificación de los plaguicidas de diferentes estructuras químicas en los alimentos y hortalizas, a concentraciones comparables a las obtenidas por GC-MS¹³².

La LC se ha acoplado a diferentes tipos de detectores de masas con el fin de determinar los niveles de residuos de plaguicidas o para dilucidar sus estructuras en muestras ambientales, alimentos de origen vegetal o alimentos para bebés^{133,134}. Sin embargo, algunos compuestos todavía son difíciles de analizar por LC-MS y requieren una derivatización, como es el caso de glifosato^{135,136}.

En los últimos años, la espectrometría de masas con analizador por tiempo de vuelo (TOF) se ha acoplado con la cromatografía líquida (LC) para la detección de residuos de plaguicidas como una excelente herramienta para la identificación y elucidación estructural de metabolitos y productos de transformación de los plaguicidas en los productos alimenticios ¹³⁷. Sin embargo, el estrecho rango dinámico de estos instrumentos limita y restringe la cuantificación exacta para la identificación y análisis de confirmación.

Tabla I.1.6. Resumen de los principales métodos de determinación de pesticidas.

Tipo de Matriz	Pesticidas Determinados	Determinación (Analizador)	Referencia
Estándares	Carbamatos Fenilureas	MS (Ion Trap)	120
Frutas y Verduras	Multiresiduo (12)	GC-MS (Ion Trap)	118
	Multiresiduo (55)	GC-MS (Time of Flight)	121
Tabaco	Organofosforados Organoclorados	GC-MS (Time of Flight)	122
Medioambientales	Atrazina Simazina	HPLC-FI	125
Hígado de Vacuno y Aves	Carbamatos	LC-UV	129
Hígado Animal	Carbamatos	HPLC-UV	130
Trigo, Lentejas, Soja, Manzana	Carbamatos	HPLC-UV	131
Plantas	Glifosato AMPA	HPLC-FI	126
Cadenas Tróficas (Suelo-Veg-Carne)	Triazinas	HPLC-DAD	123
Comidas para bebé	Multiresiduo (16)	UPLC-MS/MS HPLC-MS/MS	134
Agua y Suelo	Glifosato Glufosinato AMPA	LC-MS/MS	135,136
Agua y Alimentos	Multiresiduo	LC-TOF-MS	137
Estándares	Multiresiduo (500)	LC-MS GC-MS	127
Aceite de Oliva	Herbicidas	HPLC-MS GC-MS	128

I.1.4.3.3. Cromatografía multidimensional para la determinación de pesticidas.

El análisis unidimensional (con el uso de una única columna) de la cromatografía se ha utilizado durante muchos años como una herramienta de separación estándar para analizar compuestos en alimentos. Sin embargo, no siempre proporciona la resolución y la capacidad de separación necesaria para obtener los mejores resultados en términos de identificación de analitos, a pesar de utilizar potentes detectores de masas. Es por ello que la cromatografía multidimensional se ha convertido en una alternativa interesante para analizar muestras complejas.

La cromatografía multidimensional permite la combinación de dos o más etapas de separación independientes o casi independientes, aumentando significativamente el poder de separación de las correspondientes técnicas unidimensionales y, por lo tanto, la separación física de los analitos en muestras complejas ¹³⁸.

Las técnicas cromatográficas multidimensionales son principalmente tres, la cromatografía de gases multidimensional (multidimensional gas chromatography o *MDGC*) con el acoplamiento en dos dimensiones GC x GC ¹³⁹, la cromatografía de líquidos multidimensional (multidimensional liquid chromatography o *MDLC*) con el acoplamiento en dos dimensiones LC x LC ¹⁴⁰ y el acoplamiento *LC-MS multidimensional* ¹⁴¹.

La mayoría de trabajos para determinación de pesticidas a partir de matrices alimentarias han empleado el sistema LC-GC multidimensional basándose en la interfase conocida como *TOTAD* (Through Oven Transfer Adsorption Desorption). Se trata de una interfase que ha conseguido acoplar la cromatografía de líquidos a la de gases, de modo que no se requiere pretratamiento de la muestra y puede inyectarse directamente al HPLC, separar sus analitos y posteriormente, al atravesar un horno de adsorción-desorción, introducirse directamente en el GC.

Los principales problemas son el acoplamiento de las dos técnicas de separación que operan en diferentes estados físicos y la introducción de una gran cantidad de disolvente en la columna de GC, por este motivo se requieren interfases especiales para eliminar el exceso de disolvente de la muestra.

El papel de la LC depende de sus diferentes aplicaciones. Una simple separación de analitos a partir de compuestos de la matriz podría ser suficiente, pero a menudo la eficacia de separación y la selectividad de la columna de LC obligan a realizar una limpieza selectiva, concentración y/o fraccionamiento de la muestra. La cromatografía líquida en fase normal (*NPLC*) es compatible con el sistema de GC mientras que la cromatografía en fase reversa (*RPLC*) es mucho menos utilizada ya que genera problemas específicos difíciles de resolver.

Diferentes interfaces LC-GC han sido desarrolladas a lo largo de los años, sin embargo las primeras versiones han sido abandonadas. La elección de la interfaz dependerá de la dimensión de la fracción a transferir (nivel deseado de sensibilidad) y en el rango de volatilidad de los compuestos de interés.

En la actualidad cada vez vienen publicados más trabajos que emplean este sistema en la determinación de pesticidas en distintas matrices como en aceitunas y aceite de oliva ¹⁴²⁻¹⁴⁵, determinación en aguas ^{146,147} o en frutas y verduras como los tomates ^{148,149}.

I.1.5. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS POR UPLC-MS/MS.

Los avances en separación cromatográfica así como en las tecnologías de detección han permitido a los analistas incrementar el número de analitos determinados en un simple análisis.

Actualmente, el sistema UPLC-ESI-MS/MS permite la cuantificación de trazas de pesticidas en diversas matrices, tanto biológicas como medioambientales ¹⁵⁰.

La tecnología *UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)* acoplada a la espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo ha sido utilizada ampliamente en el análisis de pesticidas a partir de aguas naturales, bebidas o alimentos ^{151,152}. El desarrollo de las interfaces API (APCI, ESI) junto con el tándem en triple cuadrupolo ha permitido que cada

vez los métodos de detección de pesticidas sean más selectivos y sensibles. Los límites de detección en el rango de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ son hoy en día usuales para las determinaciones de estos compuestos ¹⁵³.

I.1.5.1. Introducción al sistema UPLC.

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar una muestra en sus partes individuales. Esta separación se produce en función de la interacción o afinidad de la muestra con las fases móviles y estacionarias.

Hay muchas combinaciones de fases estacionarias y móviles que se pueden emplear cuando se separan los componentes de una mezcla. Así, si los componentes son de diferentes polaridades y se emplea una fase móvil de una polaridad distinta a través de la columna, los componentes migrarán a través de la columna más rápido unos que otros en función de su afinidad por dicha fase.

El modo de separación fundamental queda determinado principalmente por el tipo de columna de elección y ésta a su vez vendrá determinada por la naturaleza del analito o analitos a separar. Todo ello puede verse resumido en la **Tabla I.1.7**.

Tabla I.1.7. Tipos de cromatografía líquida en función de la columna utilizada¹⁵⁴.

Modo Cromatográfico	Nombre completo	Fundamento de la separación
RPLC	Reversed-phase liquid chromatography	La columna es no polar (por ejemplo de C18) y la fase móvil estará compuesta de una mezcla polar de agua junto con disolventes orgánicos (como acetonitrilo, metanol, etc.). Es la técnica más utilizada para la determinación de compuestos solubles en agua.
NPLC	Normal-phase liquid chromatography	La columna es polar (por ejemplo de sílica o alúmina) y la fase móvil estará compuesta de mezclas de disolventes de baja polaridad (como el hexano). Esta técnica se usa principalmente en compuestos inmiscibles con el agua o en la determinación de isómeros.
NARP-LC	Non aqueous reversed-phase liquid chromatography	La columna es no polar (por ejemplo de C18) y la fase móvil estará compuesta de una mezcla de disolventes orgánicos. Es la técnica más utilizada para la determinación de compuestos insolubles en agua o muy hidrofóbicos.
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography	La columna es polar (por ejemplo de sílica o alúmina) y la fase móvil estará compuesta de mezclas de agua con disolventes orgánicos. Esta técnica se usa principalmente en compuestos muy polares que son pobremente retenidos en RPLC.
IEC	Ion exchange chromatography	La columna contiene grupos cargados que se pueden unir iones de la muestra de carga opuesta, y la fase móvil es generalmente una solución acuosa de una sal más tampón. Se usa para separar muestras ionizables tales como ácidos o bases, y especialmente en la separación de biomoléculas (proteínas o ácidos nucleicos).
IPC	Ion-pair chromatography	Utiliza las condiciones de la RPLC pero añadiendo un reactivo de par iónico a la fase móvil para la interacción con iones de la muestra de carga opuesta. Se usa en la determinación de ácidos y bases que son débilmente retenidos por RPLC.
SEC	Size exclusion chromatography	Utiliza una columna inerte ya sea con una fase móvil acuosa u orgánica; SEC proporciona una separación que se basa en el peso molecular y se utiliza principalmente para la separación de grandes biomoléculas o polímeros sintéticos.

En la última década los rellenos de las columnas se han hecho más uniformes y de menor tamaño. Al disminuir el tamaño de las partículas aumenta la eficacia pero también la presión en el sistema cromatográfico por lo que ha sido necesario desarrollar las denominadas “columnas de alta resolución”. El tamaño de partícula de dichas columnas es inferior a $2\mu\text{m}$, con lo que se mejora la resolución de los picos cromatográficos pero genera sobrepresiones en los sistemas, ya que la sobrepresión es inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de partícula, y a consecuencia de ello se generan sobrepresiones en el intervalo de 7.000 a 10.000 psi y por eso los equipos de cromatografía deben contar con una instrumentación adecuada que sea capaz de soportar presiones de hasta 15000 psi (1000 bar).

En el año 2004, el sistema de *Acquity Ultra performance liquid chromatography* o *UPLC* fue el primer LC diseñado para aprovechar plenamente las ventajas de rendimiento de columnas rellenas con un tamaño inferior a $2\mu\text{m}$ en la fase estacionaria¹⁵⁵.

Los principios subyacentes de esta evolución de HPLC a UPLC se rigen por la ecuación de *van Deemter*, cuya fórmula empírica describe la relación entre la velocidad lineal media de caudal de la fase móvil (v) y la altura equivalente de plato teórico (*HETP* o eficiencia de la columna). Dado que el tamaño de partícula es una de las variables, la curva *van Deemter* se puede utilizar para investigar el rendimiento cromatográfico:

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{v} + Cv$$

donde A, B y C son constantes características de cada columna.

En la ecuación de *van Deemter* se pueden apreciar tres términos: B/v que representa la difusión longitudinal de los solutos en la columna (a menor caudal mayor será el ensanchamiento por difusión), Cv hace referencia a la transferencia de masa entre las fases móvil y estacionaria (el soluto requiere un cierto tiempo entre ambas fases hasta alcanzar un equilibrio, si el caudal es demasiado elevado no se alcanzará). Finalmente, A hace referencia a la difusión turbulenta del soluto a través de la fase estacionaria, este término es independiente de la velocidad de la fase móvil y depende de las partículas que forman el relleno de la fase estacionaria. De este modo, cuanto menor es el tamaño de partícula de relleno, menores caminos preferentes pueden encontrar los solutos, ya que el empaquetamiento será mayor, mejorando la eficacia de la separación, ya que el soluto recorrerá menores distancias para alcanzar el equilibrio. El problema es que cuanto menores son las partículas de relleno mayor resistencia se opone al flujo de fase móvil por lo que hay que trabajar a alta presión.

Por lo tanto y atendiendo a la ecuación, se comprueba que mediante el uso de las partículas más pequeñas, la velocidad y la capacidad máxima (número de picos resueltos por unidad de tiempo en las separaciones de gradiente) pueden extenderse a nuevos límites, llegando a la denominada

Ultra Performance Liquid Chromatography, o UPLC. La tecnología aprovecha al máximo los principios cromatográficos, utilizando columnas de relleno con partículas más pequeñas y/o caudales más altos para una mayor velocidad, con resolución y sensibilidad superior, y pudiendo trabajar a una elevada presión.

De esta forma, el sistema UPLC presenta una serie de ventajas frente a los ya convencionales HPLC y son esencialmente cuatro:

- ✓ mayor eficacia de la columna, gracias a las partículas de menos de $2\mu\text{m}$ la eficacia es 3 veces superior a la de las partículas de $5\mu\text{m}$ (HPLC),
- ✓ mayor velocidad, las separaciones pueden realizarse con un caudal tres veces superior,
- ✓ mayor resolución que con las partículas de $5\mu\text{m}$, concretamente un 70% más de resolución,
- ✓ mayor sensibilidad, el rendimiento aumenta 9 veces sin que disminuya la resolución.

El sistema Acquity UPLC esta formado por los siguientes módulos:

- *Binary solvent manager* (BSM) o Sistema Binario de Bombeo de Disolventes utiliza dos bombas binarias de flujo individuales en serie para ofrecer un gradiente paralelo. EL BSM usa motores independientes en los pistones para conseguir un gradiente binario a alta presión que permite mover el disolvente a través del sistema proporcionando un flujo de disolvente con un caudal constante

pudiendo alcanzar velocidades de flujo entre 1-2 mL·min⁻¹ a presiones inferiores a 15000 psi.

- *Sample manager* o sistema de gestión de muestras, se trata de un mecanismo de localización que utiliza una sonda para acceder a los sitios de muestreo y extraer la muestra de ellos y la introduce en la corriente de flujo cromatográfico. La baja dispersión de la muestra se mantiene usando un proceso de inyección que la introduce por presión, lo que da lugar a que el ciclo de lavado sea más rápido. El sistema de gestión de muestras contiene un horno de columna, pudiendo alcanzar temperaturas de hasta 65°C.

I.1.5.2. Introducción a la Espectrometría de Masas.

El espectrómetro de masas es un instrumento que mide las masas de las moléculas individuales que han sido convertidas en iones previamente. Para ello, las moléculas se convierten en iones que deben entrar en el sistema en fase gaseosa y serán separados según su relación masa/carga (m/z). Un espectro de masas es una gráfica de las corrientes relativas de iones frente a la relación (m/z).

El espectrómetro de masas sirve para realizar aplicaciones tanto cualitativas como cuantitativas, de modo que puede determinar el peso molecular, identificar compuestos por su fragmentación, productos de reacción o metabolitos, caracterizar y analizar polímeros, estudiar

abundancia isotópica y determinar especies moleculares o elementos en muestras orgánicas, biológicas e inorgánicas.

La instrumentación en un sistema de masas consta de las siguientes partes que pueden verse esquemáticamente en la **Figura I.8.**:

1. Sistema de entrada de muestras,
2. La cámara de ionización donde tiene lugar la ionización de la muestra,
3. Acelerador, donde se produce la aceleración de los iones por un campo eléctrico,
4. Analizador, donde tiene lugar la dispersión de los iones según su m/z ,
5. Detector, donde se genera la detección de los iones y se produce la señal eléctrica.

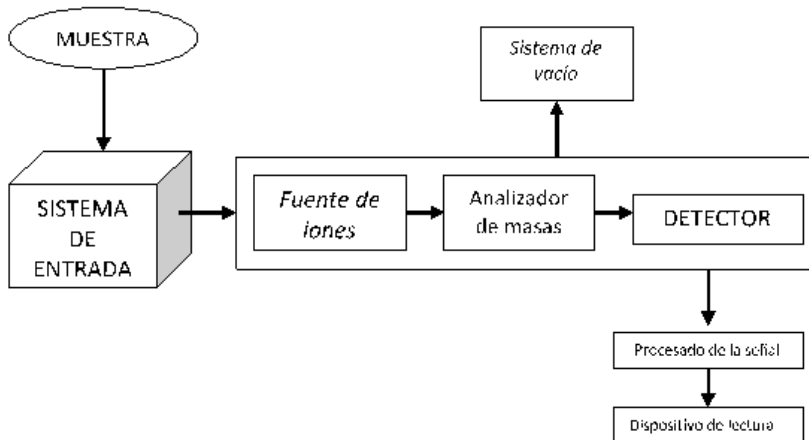


Figura I.1.8. Esquema general del funcionamiento de un Espectrómetro de Masas.

El proceso en MS se inicia en el sistema de entrada de muestras ¹⁵⁶ donde una mínima cantidad de ésta es convertida al estado gaseoso por calentamiento a unos 400°C y se introduce lentamente en la cámara de ionización. La finalidad del sistema de entrada es permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío. A continuación, tiene lugar la ionización que es el proceso de cargar positiva o negativamente a una molécula.

La ionización se consigue por medio de un bombardeo mediante electrones según el siguiente proceso:



Las fuentes de iones de los espectrómetros de masas tienen unas características comunes, pese a la variabilidad de tipos existentes y es que todas transforman los componentes de una muestra en iones. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinados en un único componente. En todos los casos, se obtiene un haz de iones positivos o negativos que posteriormente se acelera hacia el interior del analizador de masas o sistema separador a través del acelerador.

Durante el proceso, los átomos formados en la primera etapa pasan por un sistema de desorción para transformarse directamente en iones gaseosos, y una vez formados, pasan al analizador. Los analizadores separan los iones con diferentes relaciones m/z , distinguiendo entre diferencias muy pequeñas de masas y son convertidos en un flujo de iones

generalmente positivos y de carga única. La velocidad que adquieren viene regida por la fórmula

$$v = [2eV/m]^{1/2}$$

Donde V es el potencial aplicado, “e” la carga del electrón y “m” la masa. Cuando las partículas aceleradas se someten a la acción de un campo magnético (H) describen una trayectoria circular de radio *r* alrededor de este campo, desarrollando una fuerza centrífuga mv^2/r , la cual es igual a la fuerza de atracción del campo Hev . De esto deducimos que el radio es igual a: $r = (2Vm/H^2e)^{1/2}$. Basándonos en la ecuación anterior podemos calcular la relación m/e que es: $m/e = H^2.r^2/2V$. Dado que la mayoría de los iones formados en la segunda etapa tienen una sola carga y que el resto de parámetros se mantienen constantes, la relación m/e suele ser la masa del ión¹⁵⁷.

La utilidad analítica de un espectrómetro de masas depende de la resolución del instrumento, o capacidad del mismo para separar dos partículas de diferente masa.

Finalmente, la detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica se produce a través de un ordenador que está conectado al aparato y que recoge las distintas señales y las reproduce en forma de espectrograma.

El aspecto de los espectros de masas para distintas especies moleculares depende en gran medida del método utilizado para la formación de los iones. Estos métodos los podemos dividir en dos categorías ¹⁵⁸:

- Fuentes *de fase gaseosa*: primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza. Están generalmente restringidas a compuestos térmicamente estables que tengan puntos de ebullición menores de unos 500°C.
- Fuentes *de desorción*: las muestras en estado sólido o líquido se transforman directamente en iones gaseosos. Son aplicables a muestras no volátiles y térmicamente inestables y a compuestos que tienen pesos moleculares superiores de 100.000 Daltons.

Existe una amplia variedad de técnicas de ionización en la espectrometría de masas. Las técnicas de ionización se pueden clasificar como *duras* o *blandas*, en función del grado de fragmentación que ocurre durante el proceso de ionización. Las fuentes duras, comunican suficiente energía a las moléculas para que estén en un estado de energía altamente excitado y en la relajación posterior, tiene lugar la rotura de las uniones produciendo iones fragmentados, generando un espectro con muchos picos que da información acerca de la naturaleza de los grupos funcionales e información estructural de los analitos. Las fuentes blandas, dan lugar a poca fragmentación y el resultado es un espectro con muy pocos picos dándonos información útil ya que nos permite la determinación exacta del peso molecular de la molécula o moléculas.

Las fuentes de ionización más comúnmente utilizadas son la EI o ionización electrónica (dura) usada en los acoplamientos de GC-MS y entre las blandas destacan la ionización química o CI, la ionización por electronebulización o ESI que es la más utilizada en los acoplamientos actuales de LC-MS, y otras más específicas como la ionización por Desorción/Adsorción asistida por una matriz o MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) o el bombardeo por átomos rápidos o FAB (Fast Atom Bombardment).

También existen diversos tipos de analizadores, actualmente los más utilizados son los cuadrupolos, los TOF (*Time of Flight* o analizador de tiempo de vuelo) y los IT (*Ion Trap* o trampa de iones).

El instrumento *Q-TOF-MS/MS* tiene la ventaja de que es más sensible y genera la masa exacta de los iones fragmentados a partir del ion precursor, de modo que para cada fragmento se puede dar una fórmula empírica. Es un instrumento de investigación de gran alcance, adecuado para la identificación de incógnitas cuando los patrones no son fácilmente disponibles y para la identificación de compuestos nuevos. Sin embargo, no es capaz de trabajar en *MRM* o *Neutral Loss*.

El triple cuadrupolo o *TQD* tiene la capacidad única de poder trabajar en *neutral loss*. Esta característica se puede usar para identificar compuestos desconocidos que están relacionados entre sí, una característica que es útil para encontrar compuestos relacionados, o

metabolitos de los compuestos originales. El TQD también es excelente para la cuantificación de compuestos, especialmente en matrices difíciles, utilizando la función de MRM y por ello, es el instrumento más comúnmente elegido para el acoplamiento LC/MS/MS en el análisis de plaguicidas en muestras ambientales y alimentarias. Tiene la desventaja que no obtiene espectros en *full-scan* con la misma sensibilidad que la IT o los instrumentos QTOF.

El *sistema de trampa de iones* o IT, es único en su capacidad para obtener MS³ y superior. Da espectros sensibles en modo *full scan* y además, es un instrumento robusto y de bajo costo. Sin embargo, no son posibles los modos en *MRM* y *Neutral Loss*, lo que plantea la validez de sus límites de detección en comparación con el triple cuadrupolo, especialmente en matrices difíciles. Todas estas características comparativas pueden verse resumidas en la **Tabla I.1.8**.

De todos los analizadores citados anteriormente nos centraremos en el que luego ha sido utilizado en el desarrollo experimental de la tesis que se presenta.

Tabla I.1.8. Comparación de las capacidades de los diferentes analizadores de masas.

	Sensibilidad en Full-Scan	Selectividad/ Precisión	Rango Dinámico	Características / Ventajas	Contras
Triple cuadrupolo (MS/MS)	Baja	Alta/ Baja	Alto	<i>Neutral Loss</i> / Sensible para cuantificación con MRM	No masa exacta
Trampa de iones (Ion Trap-MS/MS)	Alta	Alta/ Baja	Medio	MS ⁿ / Sensible, mecanismo de fragmentación se deduce fácilmente	MRM. No es posible <i>Neutral Loss</i>
LC-TOF-MS	Alta	Media/ Alta	Medio	Masa Exacta y Sensibilidad Los de mayor sensibilidad en MS/MS. Siempre datos <i>full-scan</i> ionP.	Mayor coste
LC-QTOF-MS	Media	Alta/Alta	Medio	Masa Exacta de los fragmentos	

1.1.5.2.1. Analizador de cuadrupolo y espectrometría de masas en tandem.

Actualmente, este diseño de espectrómetro de masas es el más extendido y usado. La razón reside en el hecho que los cuadrupolos ofrecen un buen compromiso en el rango de masas (de 40 a 4000 amu), reproducibilidad y precisión para la cuantificación, además de una alta sensibilidad.

Un cuadrupolo consiste en cuatro barras dispuestas en paralelo con una alta precisión donde los polos se encuentran espaciados alrededor de unos ejes centrales. Las barras situadas en posición opuesta se les aplican

una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). Los iones son introducidos en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de un potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. De esta manera los iones describen una trayectoria que depende directamente de su relación m/z .

La separación de los iones de diferente relación m/z se produce por la vibración estable de los iones en un campo eléctrico de alta frecuencia generado entre los polos del cuadrupolo. De forma específica, los cuadrupolos son capaces de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación m/z concreta que es dirigida hacia el detector, descartando aquellas relaciones m/z mayores o menores a la seleccionada. De esta manera, el cuadrupolo actúa como un filtro de masas donde de todos los iones provenientes de la fuente sólo se van transfiriendo al detector los seleccionados, perdiéndose el resto por el camino. En ese sentido, para obtener un barrido total de masas debe ir acoplado una a una las m/z mediante la creación de campos eléctricos selectivos de cada una de ellas. En general la velocidad de escaneo suele ser de 4000-5000 amu/s.

La posibilidad de poder acoplar dos analizadores de espectrometría de masas aumenta considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece la técnica de LC-MS. Las fuentes de ionización API permiten el acoplamiento entre LC y MS, producen una suave fragmentación de las moléculas ionizadas, generando muy poca información estructural, siendo muy interesante el uso de MS/MS acoplado a LC.

La adquisición en tándem (MS/MS) ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ión en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que puedan interferir. La fragmentación en este caso se produce por la colisión del ión seleccionado con moléculas de un gas inerte, recibiendo el nombre de disociación inducida por colisión (Collision Induced Dissociation, CID). La CID se suele dividir en dos etapas: en la primera, la energía translacional del ión se convierte en energía interna tras colisionar con la molécula de gas inerte; en la segunda, esta energía interna se transforma en energía de fragmentación, dividiéndose el ión en distintos fragmentos. Estas reacciones están ligadas directamente con la composición química y la estructura de la molécula.

Tradicionalmente, la MS/MS se ha desarrollado en analizadores de tipo cuadrupolo (**Figura 1.1.9.**), donde se han acoplado dos cuadrupolos (Q) mediante uno intermedio que hacía de celda de colisión (q). En el primer cuadrupolo (Q₁) se selecciona la relación m/z de interés, que se suele denominar como ión precursor, éste pasa a través de la celda de colisión (q) dónde se fragmenta. Los iones producto son separados por el segundo cuadrupolo (Q₂). Este tipo de instrumentos se han denominado triple cuadrupolo (QqQ). Aunque se denomine triple cuadrupolo la celda de colisión suele ser un hexapolo u octapolo, ya que su diseño va dirigido a potenciar la eficiencia de la transmisión de los iones desde la celda de

colisión hasta el Q_2 , además de presentarse como un espacio adecuado para la fragmentación.

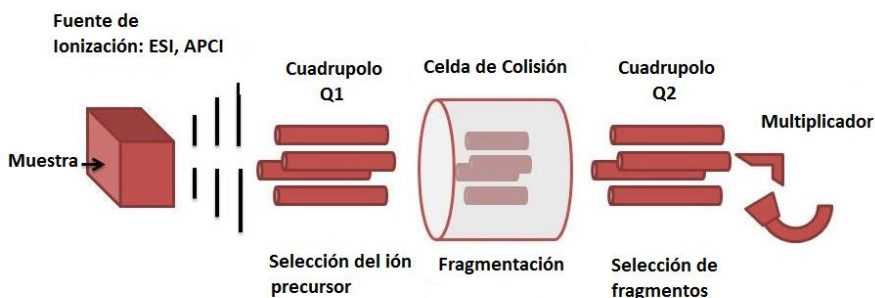


Figura 1.1.9. Esquema general del funcionamiento de un analizador MS/MS o triple cuadrupolo.

1.1.5.3. Acoplamiento UPLC-MS.

El acoplamiento del sistema UPLC con la espectrometría de masas proporciona una serie de ventajas, además de las ya descritas anteriormente hay que sumar la capacidad de identificar casi inequívocamente cualquier tipo de sustancia, desde átomos hasta moléculas complejas de peso molecular elevado. Pero además, destaca por ser una técnica rápida, de alta sensibilidad, universal y específica, que permite el análisis cualitativo y cuantitativo de todo tipo de compuestos y la identificación de una sustancia en presencia de otras similares, ya que proporciona información isotópica y estructural, energías de enlace, cinética o fisicoquímica.

El sistema UPLC-MS actualmente resuelve gran cantidad de problemas analíticos, pero como el primero utiliza elevadas presiones para generar una separación eficiente de los analitos de un líquido, y el segundo mide la relación m/z de los analitos y opera a alto vacío, presentan ciertas incompatibilidades. Los problemas a resolver son esencialmente dos ¹⁵⁹:

- transformar las moléculas en solución de la fase móvil en iones en fase gaseosa, sin que se produzca degradación térmica y,
- eliminar la gran cantidad de gas y vapor procedente de la fase móvil antes de entrar en la región de alto vacío del MS.

Estos problemas han sido solucionados gracias al desarrollo de una interfase denominada API o ionización a presión atmosférica y consta de cuatro componentes básicos ¹⁶⁰:

- Dispositivo de introducción de muestra
- Cámara de ionización, en donde se generan los iones mediante ionización por electrospray, APCI u otro mecanismo (interfase).
- Cono de muestreo (orificio de entrada de los iones).
- Sistema de transferencia de iones, en el que éstos son transportados hacia la región de alto vacío del MS.

El diseño tecnológico del sistema de transferencia de iones posee una importancia crucial para conseguir buenos niveles de sensibilidad y por ello ha sido desarrollado un sistema de transferencia de iones en forma de Z, denominado *Zspray*.

En este sistema los iones son extraídos, mediante un recorrido ortogonal, desde la fuente API hacia una cámara de vacío y de ésta a la región de alto vacío para su análisis de masas. Esta disposición física de la interfase proporciona una mayor sensibilidad, posibilita la eliminación de parte de los aductos formados en la cámara de ionización, y permite el uso de fosfatos en la elaboración de la fase móvil. Además facilita la eliminación de las moléculas neutras que hayan podido pasar desde el spray, para que no pasen al interior del MS, disminuyendo así el ruido de fondo.

La ionización a presión atmosférica puede utilizar dos modos de ionización, la ionización por electrospray (ESI) o bien por Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI).

La *interfase ESI* o ionización por electrospray consta de tres etapas (**Figura 1.1.10.**). En la primera etapa se produce la formación de gotas cargadas, para más tarde, evaporar el disolvente y fisionar las gotas que posteriormente formarán los iones en fase gaseosa.

La interfaz ESI consiste en una fuente Z-spray en la que se acopla una sonda ESI. El efluente de LC entra en la interfase a través de la sonda. Aplicando alto voltaje (2-4kV) y un flujo coaxial de nitrógeno (gas de nebulización) el efluente se convierte en un aerosol cargado. Un flujo de nitrógeno calentado (gas de desolvatación) ayuda a la evaporación del disolvente a través de la fuente.

A continuación, una pequeña cantidad del spray es arrastrada a través del orificio del cono de muestra; el resto del spray va a desecho (escape de gases). Diferencias de presión y de voltaje dirigen los iones a través del cono de muestra, del cono de extracción y las lentes hasta el analizador.

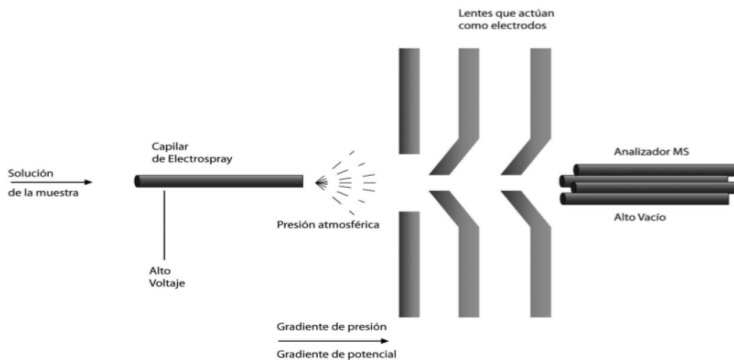


Figura 1.1.10. Etapas de la *interfase ESI* o ionización por electro spray.

Por su parte, en la interfaz *APCI* el efluente del LC entra en la interfaz a través de una sonda. Aplicando un flujo de nitrógeno coaxial (gas de nebulización) y calentando (300-600°C) el efluente se convierte en vapor. Este vapor sale por la punta de la sonda y pasa entre el cono de muestra y el electrodo de descarga de corona, en el que se aplica potencial de 2-5kV. La mayor parte del vapor va a desecho y sólo una pequeña parte pasa a través del cono de muestra.

Los iones generados pasan entonces, bien provengan de una interfaz *ESI* o *APCI* al analizador, cuyo objetivo es permitir la separación de los iones en función de su relación m/z en el tiempo o en el espacio. La dispersión

iónica se consigue mediante la aplicación de campos magnéticos o eléctricos que desvían los iones de su trayectoria en función de su masa, de su relación m/z o de su energía.

Entre los analizadores más utilizados en LC-MS destacan tres tipos, el triple cuadrupolo (*TQD*) donde se realiza la separación de los iones en el espacio ¹⁶¹, la trampa de iones (*IT*), donde la separación de los iones es en el tiempo ¹¹⁰ y el analizador por tiempo de vuelo (*TOF*), con la separación de los iones en función del tiempo de vuelo ¹¹⁷. La elección de uno u otro depende del tipo de matriz sobre la que estemos trabajando y el interés en la determinación.

I.2. PESTICIDAS EMPLEADOS EN EL CULTIVO DEL OLIVO: MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN.

I.2.1. PESTICIDAS EMPLEADOS EN EL CULTIVO DEL OLIVO.

El olivo, *Olea europaea* L., pertenece a la familia botánica *Oleaceae*, que comprende especies de plantas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. Las plantas de esta familia son mayormente árboles y arbustos, a veces trepadores. Muchas de ellas producen aceites esenciales en sus flores o frutos, algunos de los cuales son utilizados por el hombre.

Olea europaea L., el olivo, es la única especie de la familia *Oleaceae* con fruto comestible. Es una de las plantas más antiguamente cultivadas, cuyos orígenes como cultivo datan de unos 4000-3000 años a. C. en la zona de Palestina. Actualmente, el 95% del área mundial cultivada se encuentra en el área mediterránea ¹⁶².

A pesar de que el olivar puede sobrevivir en tierras poco fértiles y en condiciones semiáridas, como otros muchos cultivos está expuesto a diferentes plagas y enfermedades. Uno de los principales métodos para combatirlas las plagas de insectos es mediante el empleo de plaguicidas. Las principales plagas que afectan al olivo así como el daño que causan y el tratamiento químico a aplicar pueden verse resumidas en la **Tabla I.2.1.**

Tabla I.2.1. Principales plagas de insectos que afectan al cultivo del olivo ¹⁶².

TIPO DE PLAGA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMÚN	DAÑOS CAUSADOS AL OLIVO	APLICACIÓN DE PLAGUICIDAS
Plagas Principales	<i>Bactrocera (Dacus oleae)</i>	Mosca del olivo	Directos: ↓ peso fruto Indirectos: ↓ calidad aceites	Organofosforados/ piretroides (Spinosad).
	<i>Prays oleae (Bern)</i>	Polilla del olivo	Produce caída del fruto.	Piretroides.
	<i>Saissetia oleae (Bern)</i>	Cochinilla de la Tizne	Disminuye la brotación y la producción.	Carbaril, Fosmet, Piriproxifen.
Plagas Secundarias	<i>Phloeotribus scarabaeoides</i>	Barenillo del olivo	↓ tamaño del olivo, puede llegar a ser improductivo.	Dimetoato, Formotión, Metidatión.
	<i>Margaronia unionalis</i>	Polilla del Jamín o Glifodes	↓ productividad a alimentarse de las hojas.	Deltametrin, Dimetoato, Fosmet.
	<i>Euzophera pingüis</i>	Abichado o Euzofera	Defoliación, pueden secarse ramas y árbol.	Clorpirifos, Fenitrotión.

Otro de los problemas en el cultivo del olivo es el control de las malas hierbas. Las malas hierbas, sobre todo las perennes, tienen casi el mismo modelo de crecimiento que los olivos, compiten con ellos por el sustrato y la humedad adaptándose a las mismas condiciones, llegando a crecer más rápido que el mismo olivo debido a su mayor adaptabilidad y eficacia. Por esta razón hay que realizar un control de las mismas.

Normalmente, las malas hierbas se controlan por medios químicos o mecánicos, aunque a menudo, se combinan varias técnicas para controlarlas. El modo de acción, comportamiento y forma de empleo de los herbicidas empleados en el olivar es distinto, tal y como refleja la **Tabla I.2.2.**

I.2. Pesticidas empleados en el olivar.

Tabla 1.2.2. Modo de acción, comportamiento en el suelo y forma de empleo de los herbicidas más empleados en el olivar.

Herbicida	Modo de Acción			Comportamiento en el suelo		Forma de empleo más frecuente	Movimiento en la planta
	Residual	Contacto	Trasloción (vía floema)	Adsorción	Persistencia		
TBA	***	*	0	+++	###	Pre/post.	Xilema
Diuron	***	*	0	+++	####	Pre/post.	Xilema
Diquat	0	***	0	++++	0	Postemerg.	0
Paraquat	0	***	0	++++	0	Postemerg.	0
MCPA	*	0	***	+	#	Postemerg.	Floema
Fluroxipir	*	*	***	+	#	Postemerg.	Floema
Amitrol	*	0	***	++	##	Postemerg.	Xil/Floema
Glifosato	0	***	***	++++	0	Postemerg.	Floema
Sulfosato	0	***	***	++++	0	Postemerg.	Floema
Glufosinato	0	***	*	+++	0	Postemerg.	0
Oxifluorfen	**	**	0	+++	###	Pre/post.	0
Norfluorazona	***	0	0	+++	###	Preemerg.	Xilema
Diflufenican	**	**	0	+++	##	Post-temp	0
Flazasulfurón	**	-	***	++	#	Postemerg.	Xil/Floema

Modo de acción: (0) nula; (*) débil; (**) importante; (***) muy importante.

Adsorción: (+) débil; (**) moderada; (+++) importante; (++++) muy importante.

Persistencia en el suelo: (0) nula; (#) semanas; (##) mediana; (###) pocos meses; (####) más de 4 meses.

Movimiento en la planta: Xilema= ascendente (adsorción por raíz); Floema= descendente (absorción por partes verdes).

I.2.1.1. Consecuencia de la aplicación de plaguicidas en el cultivo del olivo.

El aceite de oliva es el aceite vegetal comestible más importante en los países mediterráneos. Esta popularidad no es únicamente por sus características sensoriales sino también, por sus aspectos nutricionales¹⁶³. Actualmente, el aceite de oliva es sinónimo de salud o de alimento que por su consumo aporta beneficios a la salud humana. Numerosas investigaciones demuestran su papel en la disminución de enfermedades cardiovasculares, en la prevención de la arteriosclerosis, en la mejora del sistema nervioso y del desarrollo óseo, en su capacidad antioxidante y en

sus propiedades anti-envejecimiento, e incluso en la prevención de tumores ¹⁶⁴⁻¹⁶⁷.

Dadas las propiedades saludables del aceite de oliva, es de interés conocer la problemática que existe actualmente con respecto a la posible presencia de residuos de plaguicidas en las aceitunas, ya que entonces estaríamos ante la paradoja de un alimento saludable que podría llegar a ser perjudicial.

Si se respetasen estrictamente las normas de uso correcto de los plaguicidas, éstos no deberían estar presentes en la aceituna en el momento de su entrada y recepción en la Almazara. Estas normas indican la necesidad de utilizar sólo materias activas autorizadas y en las dosis recomendadas. No obstante, existen determinadas prácticas inadecuadas que pueden originar la aparición de residuos de plaguicidas en las aceitunas de almazara, como pueden ser:

- ✓ no respetar los plazos de seguridad entre la aplicación y la recogida del fruto,
- ✓ utilizar dosis superiores a las indicadas,
- ✓ aplicar los herbicidas de forma que se mojen las ramas del árbol,
- ✓ aplicar el tratamiento cuando existe fruto caído en el suelo (excepto en los casos autorizados),
- ✓ emplear técnicas de recolección de la aceituna que provoquen el contacto del fruto con el suelo previamente tratado (derribo del fruto al suelo y posterior barrido o soplado).

Teniendo en cuenta que en muchas ocasiones para abaratar los costes de recolección se derriba el fruto al suelo, posiblemente la principal causa de contaminación potencial del fruto radica en esta última práctica, el método de cosecha escogido, bien sea a partir de la cosecha de aceitunas del suelo o directamente del árbol.

El método de cosecha seguido es clave a la hora de encontrar residuos en las aceitunas, especialmente si se han utilizado pesticidas aplicados al suelo ¹⁶⁸, ya que al derribar el fruto al suelo y mezclarlo con éste se propicia la posible contaminación por contacto durante el transporte a la almazara. No obstante, la aplicación de posteriores tareas de lavado del fruto propicia que la posible carga contaminante que contenga la tierra que acompaña al fruto quede disuelta en el agua de las lavadoras y por lo tanto, la carga final de plaguicidas sea disminuida ¹⁶⁹⁻¹⁷².

Sin embargo, esta maquinaria trabaja en circuito cerrado de agua, que se renueva periódicamente según el criterio de la almazara y por lo tanto, esta etapa del proceso de recepción del fruto se puede convertir en una causa de contaminación de partidas de aceituna limpia, ya que al ser “lavadas” con el agua con la que se ha tratado previamente otra partida de aceituna presumiblemente con tierra contaminada favorecería este hecho. De este modo, el proceso de lavado y selección de las aceitunas junto con el método escogido de recolección de las aceitunas se convierte en un paso crítico y fundamental.

En los últimos años han sido publicadas investigaciones concernientes al estudio de la presencia de pesticidas en las aceitunas. Asimismo, se ha comprobado que las aceitunas que provienen del árbol tienen menores residuos de herbicidas que las que han estado en contacto con el suelo ¹⁷². Igualmente, en muestras de aceitunas procedentes de Turquía han sido encontrados residuos de organofosforados como azinfos-etil, clorpirifos, clorpirifos-metil, y carbofenotionel, destacando la presencia de Clorpirifos en algunos casos por encima del *LMR* en 17 de las muestras analizadas ¹⁷³.

También, han sido encontrados residuos de Simazina, Terbutilazinaa y Diuron en el agua de lavado de las aceitunas mostrando en algunos casos valores muy por encima del *LMR* establecido por la legislación ^{169,170}. Además, ha sido probado que el proceso de lavado de las aceitunas disminuiría significativamente el contenido en residuos de las mismas ¹⁷¹.

Otras investigaciones han demostrado la presencia de residuos de pesticidas en el aceite de oliva, que si bien no lo hacen por encima del valor *LMR* que establece la Legislación actual para su seguridad, si se muestran algunas partidas positivas. *Elpiniki G. Amvrazi et al.* ¹⁷⁴ realizaron un estudio en 2009 donde fueron evaluadas 100 muestras de aceite de oliva donde casi el 90% mostraba presencia de insecticidas, y aunque casi todas las muestras fueron positivas, ninguna superó el *LMR*. No obstante, en este trabajo destaca la presencia de pesticidas en diferentes muestras de aceite de oliva virgen de distintos orígenes, incluso en aquéllos que provenían de cultivos ecológicos, así como la presencia de algunos insecticidas no

permitidos en el cultivo del olivo. También han sido encontrados pesticidas organofosforados en muestras de aceite de oliva procedente de Chile, donde el 79% de las muestras que fueron ensayadas mostraron al menos un pesticida organofosforado, siendo el Clorpirifos el pesticida más frecuentemente encontrado con valores medios cercanos al *LMR*¹⁷⁵.

En la literatura también se pueden encontrar estudios acerca de la eficiencia del refinado de los aceites con presencia de pesticidas. En un trabajo publicado en el 2009 por *A. García-Sánchez et al.*¹⁷⁶ se hacía hincapié en el hecho que la mayoría de muestras de aceite de oliva que fueron analizadas portaban residuos de pesticidas, mientras que en aceites refinados la cantidad de residuos encontrada fue mínima. No obstante, aún tras la aplicación del refinado del aceite se pudieron observar residuos de algunos pesticidas como *endosulfan sulfato*.

Por lo tanto, los posibles residuos de pesticidas que puede transportar el aceite de oliva pueden dar lugar a un potencial problema para la salud pública, lo que podría llevar a la prohibición de su comercialización por parte de las autoridades sanitarias. En base a ello, algunos estudios como los publicados en 2009 por *Martínez Nieto et al.*^{177,178} intentan conseguir la degradación fotoquímica de residuos de plaguicidas presentes en el aceite. El método presenta una alternativa para la foto-degradación completa o reducción de estos productos químicos, utilizando luz ultravioleta sin perjudicar los parámetros de calidad del aceite de oliva virgen.

Mientras tanto, el único modo para controlar que la presencia de fitosanitarios en el aceite de oliva no genere un problema en la salud de los consumidores, es determinar su concentración y comprobar en qué relación se encuentra conforme al *LMR* establecido por la Legislación Vigente en cada caso.

1.2.1.2. *LMR* de los plaguicidas más empleados en el olivar.

Según *L. M. Plaza* ¹⁷⁹ una definición simple de *LMR* podría ser "la cantidad máxima de un residuo de plaguicida que se ha encontrado o se podría esperar en un producto alimenticio, cuando las GAP o buenas prácticas agrícolas (*Good Agricultural Practices for Pesticides Uses*) han sido legalmente seguidas para el cultivo". Se expresa en mg de residuo por kg de producto alimenticio o ppm.

Si bien en esta definición no se hace referencia explícitamente a la implicación en la salud, es sabido entre las comunidades científicas y administrativas que los *LMR* de plaguicidas no corresponden con los máximos niveles toxicológicos, pero deben ser toxicológicamente aceptables para el consumo. Así que, cuando los *LMR* se fijan, se tiene cuidado para asegurar que los niveles máximos no dan lugar a preocupaciones toxicológicas. Sin embargo, se basan en datos de GAPs, es decir, la tasa de aplicación de la sustancia activa por hectárea, el número de aplicaciones, el método de aplicación, y el intervalo en días después de la aplicación y antes de la cosecha.

I.2. Pesticidas empleados en el olivar.

La legislación en España en cuanto a LMR para plaguicidas en aceitunas para elaboración de aceite es reciente, ya que antiguamente, los LMRs estaban fijados únicamente para las aceitunas, sin especificar si eran para fabricación de aceite o aceitunas de mesa, mientras que los niveles para el aceite no han sido publicados todavía.

Los niveles de contaminación máximos aceptables para los plaguicidas más comúnmente usados en el cultivo del olivo serían los que a continuación se detallan en la **Tabla I.2.3.** ¹⁸⁰.

Tabla I.2.3. LMR expresados como mg·kg⁻¹ de los principales plaguicidas usados en el cultivo del olivo. Fuente: EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005 (MRLs updated on 07/07/2015).

PESTICIDAS	Aceitunas de Mesa	Aceitunas aceite	Aceite de oliva**	Fuente	Notas
DIMETOATO	2,00	2,00	10,00	Reg. (EC) No 1097/2009	Dimetoato+ometoato.
CLORPIRIFOS	0,05*	0,05*	0,25	Reg. (EC) No 839/2008	Soluble en grasas.
FOSMET	3,00	3,00	15,00	Reg. (EU) No 737/2014	Fosmet+fosmet oxon.
DELTAMETRIN	1,00	1,00	5,00	Reg. (EU) No 441/2012	Soluble en grasas.
SPINOSAD	0,02*	0,02*	0,10	Reg. (EU) No 737/2014	Soluble en grasas. Suma Spinosin A y D.
PIRIPROXIFEN	0,05*	0,05*	0,25	Reg. (EU) No 737/2014	Soluble en grasas.
DIFLUFENICAN	0,05*	0,20	1,00	Reg. (EU) No 897/2012	
DIURON	0,01*	0,02*	1,00	Reg. (EC) No 777/2013	
TBA	0,05*	0,05*	0,25	Reg. (EC) No 149/2008	
AMITROL	0,05	0,05	0,25	Reg. (EU) No 1127/2014	
OXIFLUORFEN	1,00	1,00	5,00	Reg. (EC) No 149/2008	
GLUFOSINATO	0,50	0,50	2,50	Reg. (EU) No 491/2014	Suma de glufosinato, sus sales, MPP y NAG.
FLAZASULFURON	0,01*	0,01*	0,05	Reg. (EU) No 289/2014	
GLIFOSATO	1,00	1,00	5,00	Reg. (EU) No 293/2013	

*Indica el valor más bajo para su determinación analítica.

**Por regla general, los límites aceptados para el aceite de oliva son cinco veces el LMR en aceitunas.

I.2.2. MÉTODOS ACTUALES PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITE DE OLIVA Y ACEITUNAS.

I.2.2.1. Métodos de Extracción y Purificación empleados en el análisis de pesticidas en aceitunas y aceite de oliva.

El estudio de los residuos de pesticidas en el aceite de oliva o en las aceitunas es hoy día un reto debido a la complejidad inherente de la matriz, compuesta principalmente de triglicéridos. La solubilidad en grasas de algunos pesticidas aplicados a las aceitunas destinadas a la producción de aceite es por lo tanto, un parámetro importante que debe ser considerado ya que ha sido demostrado que los plaguicidas liposolubles tienden a concentrarse en el aceite de oliva durante su producción. Por esta razón, mayores niveles de concentración de pesticidas liposolubles son encontrados en el aceite y no en las aceitunas. Por el contrario, los pesticidas polares aplicados a las aceitunas no tienden a pre-concentrarse durante producción de aceite de oliva, por lo que sus niveles serán más altos en muestras de aceitunas ¹⁸¹.

Todo esto conlleva la necesidad de extraer o aislar los pesticidas de la matriz lipídica. Sin embargo, es muy complicado evitar la co-extracción del material lipídico, ya que muchos pesticidas son solubles en grasas o compuestos no polares y por lo tanto, es necesario obtener un extracto libre de grasa, no sólo para evitar daños en partes de los instrumentos que incluso con muy pequeñas cantidades de lípidos pueden dañar columnas y

detectores y suprimir la señal cromatográfica, sino que además, eviten la presencia de posibles interferencias.

A grandes rasgos, podemos decir que la mayor parte de los métodos de extracción de pesticidas presentes en aceitunas o aceites se basan en dos pasos fundamentales, primero una etapa de extracción de los pesticidas de la matriz que los contiene mediante el uso de disolventes orgánicos, seguido de una etapa de purificación, a fin de obtener un extracto limpio de grasas y apto para el análisis.

Muchas técnicas de extracción empleando diferentes sistemas de *clean up* han sido utilizadas hasta la fecha para la determinación de pesticidas en aceitunas y aceite de oliva, destacando tres métodos esencialmente: GPC, *QuEChERS* y MSPD.

1.2.2.1.1. Métodos de Extracción en aceitunas y aceite de oliva.

La técnica de extracción más empleada en los laboratorios de rutina para el análisis de pesticidas en el caso del *aceite de oliva* es la extracción líquido-líquido (*L-L*) utilizando disolventes orgánicos como el ACN, MetOH o la saturación de ACN en *n*-hexano, seguida de una etapa de purificación a través de una extracción en fase sólida o SPE o bien por Cromatografía por Permeación en Gel (*Gel Permeation Chromatography*, GPC) generalmente mediante el uso de la GC acoplada a diferentes detectores (ECD, NPD y MS) ^{176,182,183}. Esta técnica ha sido descrita ampliamente en la literatura ^{104,172,184}.

En el caso concreto de la determinación de pesticidas en *aceitunas*, podemos encontrar distintos procedimientos de extracción/separación donde se requiere que la muestra esté totalmente homogénea. Los más extendidos son los basados en la extracción sólido-líquido (*S-L*) seguida de metodologías de limpieza de los extractos a través de *SPE* o *GPC*, como en el caso de los extractos del aceite de oliva¹⁷².

La extracción sólido-líquido en muestras de *aceitunas* se basa en triturar primero las *aceitunas*, mezclar la pasta junto con un adsorbente para eliminar la posible presencia de agua como sulfato de sodio o magnesio anhidro, y a continuación, se suelen realizar dos extracciones con *ACN*, *MetOH*, éter de petróleo u otro tipo de disolvente o mezcla de ellos, con la ayuda de un mezclador de alta velocidad.

1.2.2.1.2. Métodos Purificación de pesticidas en aceitunas y aceite de oliva.

Las técnicas de purificación más empleadas en los laboratorios de rutina para el análisis de pesticidas se basan en una *SPE* de los extractos procedentes de la etapa de extracción bien sea *S-L* o *L-L*. No obstante, en los últimos años la purificación de los extractos a través de *GPC* generalmente mediante el uso de la *GC* acoplada a diferentes detectores (*ECD*, *NPD* y *MS*)^{176,182,183} está siendo más utilizada.

Los sistemas de *GPC* constan principalmente de columnas hechas de microesferas de un polímero poroso que permite la separación de los

compuestos de acuerdo a sus pesos moleculares, de modo que cuando una alícuota de extracto de aceite es introducida en el sistema los compuestos se eluyen de mayor a menor peso molecular, de modo que las fracciones de mayor peso molecular (triglicéridos, pigmentos, etc) se separan de las de menor peso como los pesticidas.

Los sistemas de GPC normalmente van acoplados a un loop donde las partículas de elevado peso molecular son descartadas a través de una válvula, mientras que la fracción de pesticidas es introducida en el sistema cromatográfico directamente o bien a través de un colector de fracciones tal y como puede verse esquemáticamente en la **Figura 1.2.1**.

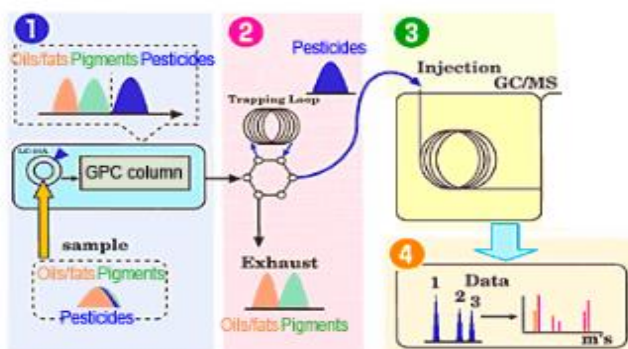


Figura 1.2.1. Montaje experimental requerido para un método de GPC.

Este método proporciona buenas tasas de recuperación y puede ser automatizado fácilmente, usando el software apropiado, lo que supone una ventaja frente a otros de tipo manual como la SPE. Por el contrario, esta metodología presenta importantes desventajas ya que es difícil

establecer las condiciones óptimas para discriminar completamente entre la fracción de pesticida y el resto de los componentes de la matriz, ya que ambas fracciones se superponen parcialmente. Además, son muchos los costes de adquisición, mantenimiento y disolventes tóxicos consumidos por este tipo de análisis.

La *SPE* es una alternativa al *GPC* e implica el uso de varias etapas de extracción y limpieza. Este procedimiento comprende generalmente una etapa preliminar con separación *L-L* seguido de una o más etapas de extracción y limpieza, utilizando diferentes tipos de adsorbentes como Florisil, alúmina, aminopropil, sílice o carbón grafitizado (*GCB*)^{101,185,186}. Los resultados que se obtienen con este método dan unos elevados rendimientos de recuperación y generan unos extractos limpios con menor consumo de disolventes orgánicos. Por el contrario, estos métodos consumen mucho tiempo y son bastante laboriosos.

1.2.2.1.3. Otros Métodos de Extracción/Purificación de pesticidas en aceitunas y aceite de oliva.

En los últimos años han sido desarrolladas dos metodologías alternativas para la determinación de pesticidas que engloban las dos etapas de extracción y limpieza. Por una parte, la llamada ***QuEChERS*** (correspondiente a las siglas del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), aplicable a un amplio número de matrices y que desde su introducción ha sido aceptado por muchos analistas de residuos de pesticidas, aunque ha tenido que sufrir algunas modificaciones con

respecto al original a fin de asegurar la extracción eficiente de compuestos dependientes de pH, reducir al mínimo la degradación de compuestos termolábiles y ampliar el rango de matrices aplicables ¹⁸⁷.

La otra metodología de extracción de pesticidas es la llamada *MSPD* (*matrix solid-phase dispersion*). Se trata de un método basado en una *SPE* donde parte de la masa de aceituna es mezclada con un fino material adsorbente como aminopropil, sílice, alúmina o C₁₈ en un mortero y a continuación, se introduce en una mini columna o cartucho que contiene previamente un material como Florisil que actúa de purificante de la muestra. Finalmente, los analitos de la muestra son eluidos tras la introducción de un disolvente de extracción ¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

1.2.2.2. Método de extracción “*QuEChERS*”.

1.2.2.2.1. Generalidades sobre el método QuEChERS.

El método conocido como “*QuEChERS*” fue introducido en el año 2003 por *Anastassiades & Lehotay* ¹⁸⁹ para determinar residuos de pesticidas en matrices alimentarias, dando buenos resultados en cuanto a calidad, rapidez y facilidad, siendo además, más económico. Posteriores estudios han llegado más lejos, llegando a validar el método para centenares de pesticidas y mejorando los resultados para aquellos analitos que resultaban problemáticos.

Actualmente, el método *QuEChERS* se ha convertido en un método de extracción muy utilizado en la determinación de plaguicidas en matrices

alimentarias. No obstante, para corregir el factor de la diferente naturaleza de las matrices alimentarias en los últimos tiempos ha sufrido algunas modificaciones como por ejemplo, en función del contenido de grasa de la matriz ^{117,118,190}.

Este método se basa en una primera etapa de extracción *L-L* con ACN, seguido de una etapa de limpieza de tipo SPE utilizando diferentes tipos de absorbentes, lo que ha generado diversas versiones desde el original: la versión tampón acetato se ha convertido en el método oficial de la AOAC como *método AOAC Oficial 2007.1* ^{191,192} o en la versión con tampón citrato como método estándar *EN 15662* del Comité Europeo de Normalización (CEN) ^{193,194}.

La popularidad de este método frente a otros métodos de extracción de residuos de pesticidas radica no sólo en la sencillez, rapidez o robustez que mencionamos anteriormente, sino en que además, genera elevados porcentajes de recuperación para un amplio rango de pesticidas polares y volátiles así como una elevada precisión, rendimiento, menor gasto de disolventes, utilización de poco material de laboratorio y sobretodo, que se trata de un método relativamente económico ¹⁹⁵.

El procedimiento original consiste en homogeneizar la muestra y a continuación extraer ya sea manualmente o bien mediante un vortex los pesticidas, incluyendo la misma cantidad de ACN que de muestra para obtener un extracto final suficientemente concentrado, que no requiere el paso de evaporación del disolvente. Una de las ventajas es la de realizar la

extracción con ACN, ya que este disolvente se separa más fácilmente del agua con la adición de sales, tales como el sulfato magnésico en combinación con el cloruro sódico, lo cual genera una separación de fases sin dilución con disolventes orgánicos apolares y una mejora en los porcentajes de recuperación de los pesticidas, incluyendo los menos polares¹⁹⁶.

El procedimiento analítico inicial se basaba en la siguiente secuencia de pasos:

1. 10g de muestra (previamente homogenizada) son introducidos en un tubo de Teflón, y se añaden 10mL de ACN,
2. Se agita el tubo vigorosamente durante 1min.
3. Se añaden 4g de $MgSO_4$ y 1g de NaCl,
4. Se agita la mezcla vigorosamente durante 1min.
5. Tras centrifugar se toma una alícuota y se añaden $MgSO_4$ + PSA.
6. Se agita durante 30s y se centrifuga.
7. Se recoge una alícuota y se añade 0.1% de ácido fórmico.
8. La determinación del pesticida generalmente se realiza por GC-MS o LC-MS.

Todos los pasos descritos en la secuencia anterior, varían en función de la naturaleza del pesticida que queremos determinar (por ejemplo, polaridad o acidez) y también de la naturaleza de la matriz que los contiene.

Para evitar el uso de co-disolventes durante la fase de extracción que a menudo son tóxicos y caros, una serie de experimentos fueron llevados a cabo durante el desarrollo de la metodología *QuEChERS* con la adición de diversas sales, destinadas a provocar la separación de las fases. Entre la gran diversidad de sales probadas, fue el sulfato magnésico anhidro (MgSO_4) el que produjo la reducción efectiva de la fase acuosa que facilita la compartimentación de los analitos polares en la fase orgánica y la mayor recuperación de los plaguicidas, en especial los muy polares. Al variar la cantidad de NaCl añadido a la muestra durante la transferencia de fases con MgSO_4 es posible controlar el rango de polaridad del método y por lo tanto la cantidad de interferentes en el extracto.

Los experimentos demostraron que una mezcla de 4 g de MgSO_4 con 1g de NaCl evitaba la co-extracción de interferentes y por lo tanto, fue la elegida ¹⁸⁹. De este modo el MgSO_4 es un agente que retiene el agua y su hidratación es altamente exotérmica (alrededor de 40°C) pero no lo suficiente como para volatilizar o degradar los pesticidas, mejorando así la extracción y ayudando a verificar que la eliminación del agua ha sido efectiva.

Los autores del método *QuEChERS* expresaron la opinión de que la *agitación* se debía utilizar siempre en lugar de *mezclar*, ya que la agitación ofrecía las siguientes ventajas sobre la mezcla:

- ✓ durante la agitación, la muestra no entra en contacto con las superficies de metal activo del “blender” o licuadora y no genera calor debido a la fricción,
- ✓ se evita la limpieza del vaso de la licuadora entre las extracciones de muestras consecutivas,
- ✓ la agitación se lleva a cabo en un recipiente cerrado, lo que es más seguro, porque no se emiten vapores de disolventes;
- ✓ los gastos de adquisición y mantenimiento de un mezclador vórtex es menor que el de una licuadora.

Tras la centrifugación y separación en dos fases de la disolución, se procede al llamado “*clean up*” que consiste en un procedimiento de *SPE* en el cual se utiliza una mezcla de $MgSO_4$ con una amina primaria y secundaria (PSA) junto con el extracto procedente de la centrifugación. El agente PSA es un adsorbente intercambiador de aniones débil que tiene la habilidad de eliminar los ácidos grasos, azúcares y algunos otros co-extractantes de la matriz que tienen capacidad de formar puentes de hidrógeno.

En el caso de muestras con elevado contenido en grasa, el método también muestra diferencias. La solubilidad de las grasas en la capa de ACN es muy limitada, ya que la excesiva presencia de grasas en la muestra formaría una capa adicional dentro de la cual los analitos podrían quedarse y por lo tanto perderse. Esto depende de la cantidad de lípidos que contenga la muestra, así como de la polaridad de los analitos, ya que los analitos apolares presentarían las mayores pérdidas. Por ello, en los casos

donde la cantidad de grasa es mayor 0,3 g de grasa/10mL ACN se recomienda emplear el patrón interno al final del procedimiento ¹⁸⁷.

Otras modificaciones a tener en cuenta al aplicar esta metodología son:

- si la matriz tiene un contenido en agua < 80% se deben añadir 10mL de agua antes de la extracción inicial,
- si el contenido en agua es < 25% (como por ejemplo en muestras de cereales) el tamaño de la muestra se debe disminuir hasta llegar entre 1-5g en lugar de los 10g iniciales,
- la adición de agua debe producirse a bajas temperaturas, del orden de 4°C para compensar el calor que se desarrolla como consecuencia de las sales o adsorbentes que se utilizan.

En la actualidad el método *QuEChERS* más usado en el análisis de pesticidas en matrices alimentarias es empleando tampón acetato o citrato, aunque presenta algunas diferencias en la fase de purificación en función del tipo de matriz sobre la que se determinen los pesticidas. Los absorbentes generalmente utilizados son el *MgSO₄ anhidro* para eliminar el exceso de agua, *PSA* para eliminar el contenido en ácidos grasos, azúcares o ácidos orgánicos, *C₁₈* para eliminar los lípidos y esteroides y *GCB* para eliminación de pigmentos y esteroides.

Los resultados de este método han sido muy buenos para la mayoría de las determinaciones de plaguicidas en frutas y hortalizas, exceptuando

determinados plaguicidas que presentaron problemas de estabilidad con el pH¹⁹¹.

En la **Tabla I.2.4.** se puede observar un resumen con diferentes matrices de origen vegetal sobretodo frutas y verduras, así como numerosas adaptaciones del método *QuEChERS* original tanto en la etapa de extracción como en la de purificación.

I.2. Pesticidas empleados en el olivar.

Tabla I.2.4. Resumen de las principales modificaciones del método QuEChERS para la determinación de residuos de pesticidas en matrices alimentarias en función del tipo de matriz.

Matriz Vegetal	Detección	% Rec (RSDs)	Pesticidas	Modificación del QuEChERS	Tipo de Clean Up	Ref.
Rábano y Repollo	GC-MS	80-115% (<15%)	107	El extracto se refrigera 30 min hasta alcanzar 4°C.	50 mg PSA + 300 mg MgSO ₄	197
Tomate, naranja, pera	LC-MS	70-120% (<20%)	160	15g muestra + 15mL ACN + 2,5g NaCl + 6g MgSO ₄ .	250mg PSA + 750mg MgSO ₄	198
Trigo, pepino y vino	LC-MS	70-120% (<20%)	90	QuEChERS usando tampón acetato ¹⁹¹ .	No	199
Frutas y verduras	LC-MS/MS	-----	150	QuEChERS usando tampón acetato ¹⁹¹ .	250mg PSA + 750mg MgSO ₄	200
Zumos de fruta	UPLC-MS	70-108% (<20%)	90	QuEChERS usando tampón acetato ¹⁹¹ .	No	151
Plátanos	GC-NPD	67-118% (<16)	11	QuEChERS usando tampón citrato + baño de ultrasonidos	125mg PSA + 750 mg MgSO ₄	79
Uvas, Mostos y vinos	LP-GC/MS	52-121% (≤20%)	27	QuEChERS usando bajas presiones para aumentar la rapidez en la determinación por GC.	PSA + MgSO ₄ + C ₁₈	201
Patatas y naranjas	LC-MS/MS	73-124% (<19%)	55	QuEChERS con 0.1% acético en la extracción ¹⁸⁹ .	50 mg PSA + 150 mg MgSO ₄	202
	LC-MS/MS	66-124% (<19%)	52	QuEChERS usando tampón acetato ¹⁹¹ + acético en la extracción (0,1% acético).	50 mg PSA + 150 mg MgSO ₄	203
Albaricoque, cereza, ciruela y nectarinas.	GC-MS	70-120% (<17%)	14	QuEChERS usando tampón citrato.	150 mg PSA + 900 mg MgSO ₄	190
Hojas de té	GC-MS	62-119% (<21%)	234	Muestra + 10mL de agua + 10mL de ACN (0,5% acético). La mezcla se refrigera 30min hasta alcanzar los 4°C.	50 mg PSA + 300 mg MgSO ₄ + 30mg GCB	204
	UPLC-MS/MS	70-120% (<20%)	65	Muestra + 10mL de agua + 10ml de ACN (1% acético) + acetato sódico. La mezcla se refrigera hasta alcanzar 4°C.	SPE: GCB + silicagel aminopropil silanizado	205
Zumo de caña de azúcar	GC-ECD	62.9-107.5% (<18%)	7	QuEChERS: 10g muestra + 10ml ACN + 1g NaCl + 4g MgSO ₄	200 mg PSA + 600 mg MgSO ₄	206
Frutas y verduras	GC-MS	80-116% (<20%)	121	QuEChERS con tampón citrato y modificación: 15g muestra + 10mL ACN + 1,5g NaCl + 6g MgSO ₄	125 mg PSA + 750 mg MgSO ₄	207
Manzana y Uvas	LC-MS/MS	97-101% (<5%)	18	QuEChERS: 10g muestra + 10mL ACN + 1.5g NaCl + 6g MgSO ₄	400mg PSA + 1,2 g MgSO ₄	208
Arroz	GC-MS/MS	70-122.7% (<20%)	124	5g muestra + 10mL agua + 10mL ACN + baño 4°C 30 min. La mezcla se une a 4g MgSO ₄ + 1g NaCl + centrifuga 20min 4000 rpm a -10°C.	375 mg PSA +750 mg MgSO ₄	209

I.2.2.2. Modificaciones del Método QuEChERS.

Desde el año 2003 numerosas modificaciones del método *QuEChERS* han sido empleadas, no obstante dos han sido las más significativas y las que mejores resultados han ofrecido a la hora de determinar los pesticidas. Por un lado, destaca el método *QuEChERS con tampón acetato*^{191,210} en el que se sustituye el NaCl del método original por acetato de sodio como tampón (**Figura I.2.2.**), y por otra, destaca el método *QuEChERS con tampón citrato* o *Método Europeo EN15662* (**Figura I.2.3.**) similar al anterior excepto en el uso de NaCl, donde además de esta sal se utiliza citrato sódico dihidrato y citrato de sodio sesquihidrato en lugar del acetato de sodio^{193,194,211}.

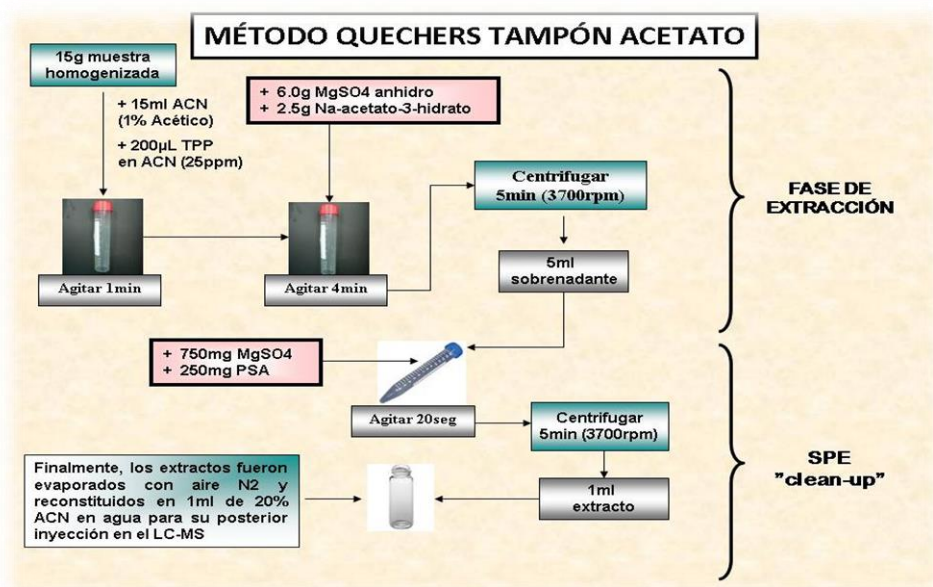


Figura I.2.2. Esquema del método *QuEChERS* empleando tampón acetato durante la etapa de extracción en sustitución del NaCl. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas en verduras publicado en el año 2011 por *Béla Kmetllár et al.*²⁰⁰.

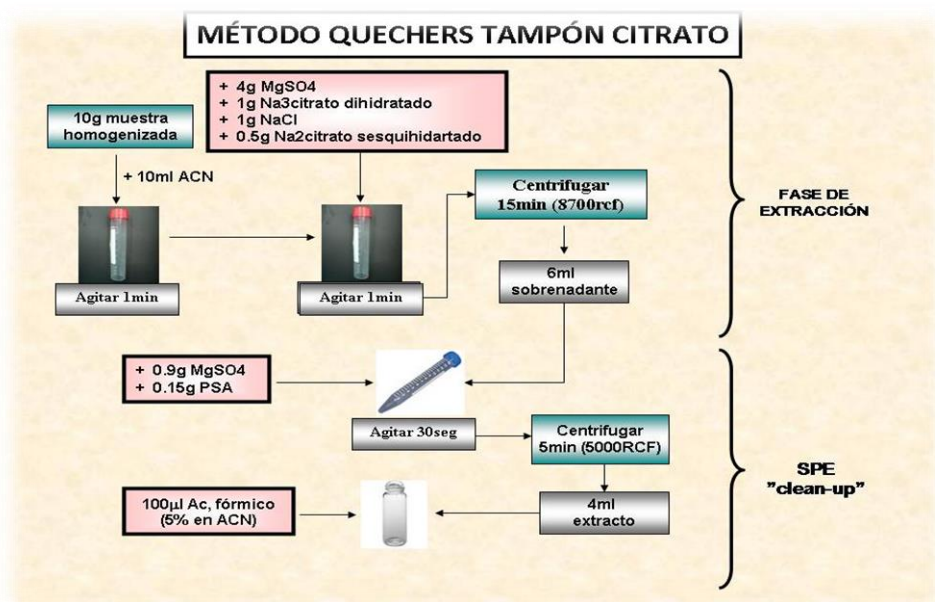


Figura I.2.3. Esquema del método *QuEChERS* empleando tampón citrato durante la etapa de extracción. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas organoclorados en frutas publicado en el año 2011 por Ewa Cieslik *et al.* ²¹¹.

En lo que respecta al método *QuEChERS* con tampón acetato, existen en la literatura algunos trabajos en los que se ha visto que la adición de acetato amónico en lugar del acetato sódico daba mejores resultados en cuanto a sensibilidad y porcentajes de recuperación. Además, también se ha comprobado su efectividad sin necesidad de utilizar la fase de *clean up* en matrices con bajo contenido graso ²¹² y sin necesidad de incorporar un gran número de adsorbentes en matrices grasas como las aceitunas, únicamente empleando cartuchos de Florisil ²¹³.

Aunque existen en la literatura otras variantes o modificaciones del *QuEChERS*, hay que tener en cuenta que cada uno da mejores resultados en una u otra matriz. En este sentido, en el año 2011 fue publicado una comparación de ambos métodos *QuEChERS*, bien tamponado con citrato o bien con acetato y con o sin *clean up* frente al original para el análisis de 42 plaguicidas incluyendo insecticidas, herbicidas y fungicidas utilizados en el cultivo del arroz ²¹⁴. Así fueron empleados cuatro métodos:

- ✓ método *QuEChERS* original ¹⁸⁹,
- ✓ método *QuEChERS* tampón citrato con *clean up* ¹⁹³,
- ✓ método *QuEChERS* tampón citrato sin *clean up* con PSA,
- ✓ método *QuEChERS* tampón acetato ¹⁹¹ sin *clean up*.

Entre los cuatro, el método *QuEChERS con tampón acetato* dio mejores resultados que los otros tres métodos ensayados y además, demostró ser la metodología más sencilla y rápida para desarrollar en un laboratorio de rutina de análisis de pesticidas sin necesidad de pasos de limpieza. Por otra parte, dicho método proporcionó cromatogramas más limpios que en el resto de procedimientos del *QuEChERS*, y por consiguiente un menor efecto matriz.

1.2.2.2.3. Método QuEChERS en aceitunas y aceite de oliva.

En el caso de las aceitunas y el aceite de oliva, dado que son matrices con elevado contenido graso, el método *QuEChERS* ha sido ligeramente modificado a partir del original para intentar eliminar lo más eficazmente

posible el contenido graso de los extractos. Uno de los primeros trabajos que aplicó este método fue publicado por *S. Cunha & S. Lehotay* en el año 2007²¹⁵. En éste trabajo, los autores estudiaron el uso de cuatro diferentes adsorbentes en la etapa de purificación (PSA, GCB, C-18 y $MgSO_4$), concluyendo que una mezcla de estos adsorbentes en proporción 1:1:1:4 respectivamente, era la mejor opción para obtener porcentajes de recuperación satisfactorios para un gran número de pesticidas (alcanzando valores de recuperación entre el 88-130% con *RSDs* < 10%). El esquema general seguido tanto para aceitunas como para aceite de oliva, puede verse en la **Figuras 1.2.4.** y **1.2.5.**, respectivamente.

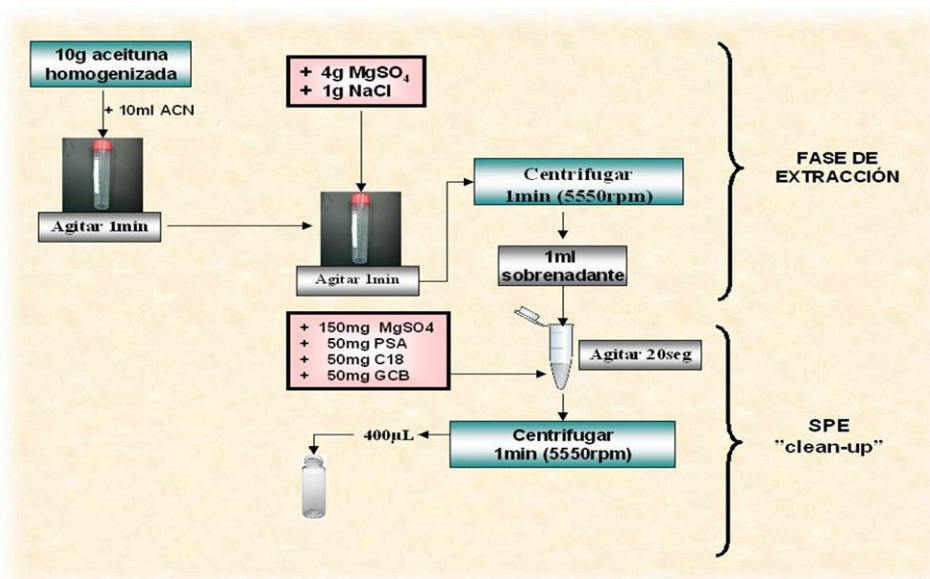


Figura 1.2.4. Esquema del método *QuEChERS* original empleando varios adsorbentes durante la etapa de purificación. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas en aceitunas publicado en el año 2007 por *S. Cunha et al.*²¹⁵.

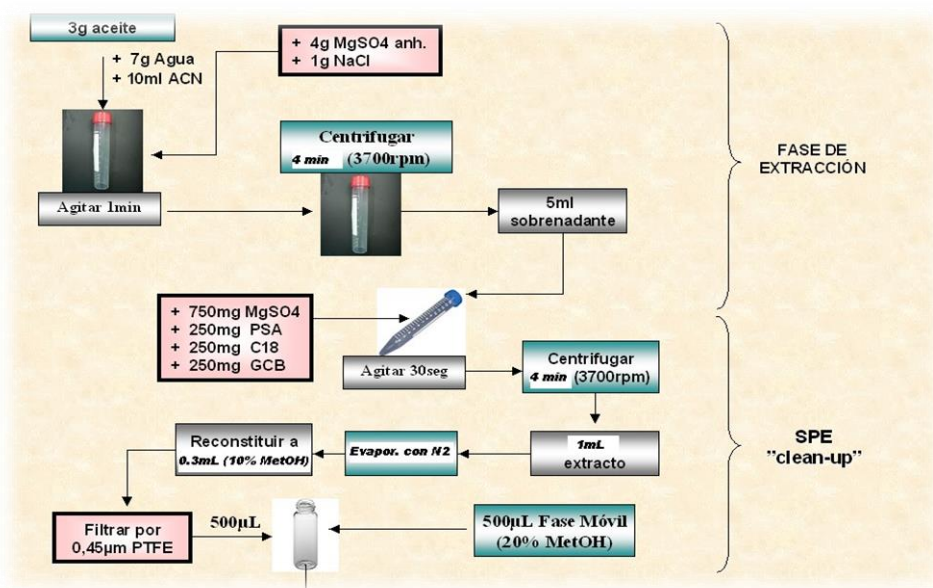


Figura 1.2.5. Esquema del método *QuEChERS* original empleando varios adsorbentes durante la etapa de purificación. Procedimiento empleado en la extracción de pesticidas en aceite de oliva publicado en el año 2007 por S. *Cunha et al.* ²¹⁵.

Otros autores también han aplicado este procedimiento incorporando algunas modificaciones. Así, en el año 2008, A. *Garrido Frenich et al.* realizaron un trabajo para determinar 53 pesticidas en aceitunas aplicando el método *QuEChERS* en su versión tampón acetato ²¹³ obteniendo recuperaciones entre 75-115% y *RSDs* < 19%. En este trabajo además, se introdujo una modificación de la etapa de purificación en la que únicamente se emplea florisil para limpiar los extractos encontrándose resultados igualmente satisfactorios que usando los propios del método.

Por su parte, *B. Gilbert-López et al.*²¹⁶ realizó un trabajo también para determinar pesticidas en aceitunas basándose en el método *QuEChERS* descrito por *S. Cunha & S. Lehotay* en el año 2007²¹⁵ con la única diferencia de que el contenido final en agua del extracto analizado por LC-MS fuera del 75%, encontrándose porcentajes de recuperación entre 70-120% y *RSDs* < 20%. También se realizó este ensayo en aceite de oliva²¹⁷ logrando nuevamente resultados satisfactorios.

Más adelante, en el año 2011 los mismos autores publicaron dos trabajos para determinar insecticidas utilizando el procedimiento *QuEChERS* en aceite de oliva²¹⁸ y aceitunas²¹⁹, obteniéndose recuperaciones entre 87-116% y *RSDs* < 8% para el primero, y con 80-119% con *RSDs* < 20% para el segundo, sin necesidad de una etapa de *clean up*.

Posteriormente, fue publicado un trabajo por *M.I. Cervera et al.*¹²¹ en el que se aplicaba el método *QuEChERS* en su versión tampón acetato (*pH* de 4.8) y en el que se obtuvieron notables porcentajes de recuperación para un total de 55 pesticidas en diferentes matrices vegetales (70-120% con *RSDs* < 20%) pero en el que se especifica que aunque el procedimiento fue aplicado a la determinación de estos pesticidas en aceitunas, desgraciadamente no fue posible conseguir resultados favorables, si bien es cierto, el método de limpieza de los extractos carecía de GCB, por lo que el efecto matriz producido por la presencia de pigmentos en los extractos pudo influir en el resultado.

Finalmente, también fue publicado un estudio por *A. Ruiz-Medina et al.*²²⁰ para determinar carbaryl en muestras de aceite comestible donde se obtuvieron porcentajes de recuperación entre el 85-115% con RSDs < 6% en el que se pone de manifiesto la versatilidad de este procedimiento con diferentes técnicas de determinación de analitos como en este caso a través de un sistema automatizado *FIA*.

1.2.2.3. Método de extracción “MSPD”.

La metodología MSPD, dispersión de la matriz en fase sólida o en inglés *Matrix Solid-Phase dispersion*, fue introducida en 1989 para la extracción de analitos orgánicos a partir de matrices sólidas. En un primer momento está técnica se desarrolló para extraer los residuos veterinarios de matrices biológicas complejas tales como el hígado, el músculo y la carne²²¹.

Sin embargo, en la actualidad ha demostrado ser una técnica eficiente para el aislamiento de una amplia gama de medicamentos, pesticidas, constituyentes de origen natural, y otros compuestos de una amplia variedad de plantas complejas y muestras de animales. Así, se ha demostrado su aplicabilidad para extraer analitos orgánicos como los pesticidas a partir de matrices tales como vegetales²²²⁻²²⁴, frutas^{225,226} y zumos de frutas²²⁷⁻²²⁹, té²³⁰, tabaco²³¹, pescado²³² y también en aceitunas y aceite de oliva^{186,188,216,217,233,234}.

I.2.2.3.1. MSPD para la determinación de pesticidas en aceitunas.

En el caso concreto de las aceitunas, la MSPD es una técnica de extracción a *microescala*, que utiliza menos de 1 g de muestra y además consume poco volumen de disolvente. Se trata de una estrategia basada en la SPE, donde son mezcladas una dispersión fina de la matriz con un material absorbente como el aminopropil en un mortero.

A continuación, la mezcla es introducida en una minicolumna donde los analitos son eluidos con un volumen relativamente pequeño de un disolvente adecuado de elución. Este paso puede llevarse a cabo junto con una limpieza de los extractos incorporando Florisil o sílice en la parte inferior de la misma columna, de modo que la muestra se va limpiando a medida que eluyen los analitos. Un esquema de este procedimiento puede verse resumida en la **Figura I.2.6**.

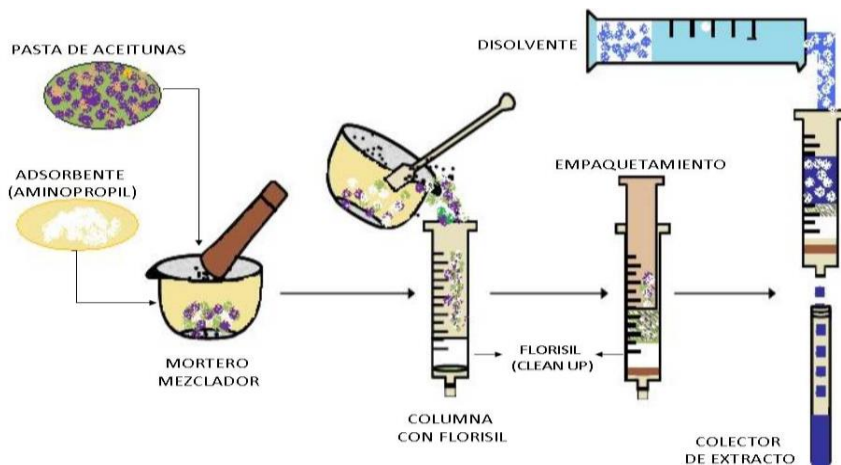


Figura I.2.6. Esquema de un procedimiento MSPD para el análisis de pesticidas en aceitunas.

I.2.2.3.2. Determinación de pesticidas en aceite de oliva por MSPD.

En el caso del uso de esta técnica en aceite de oliva, la etapa MSPD viene precedida de una etapa de separación L-L para eliminar parte de la carga de triglicéridos del aceite y para ello se suele utilizar ACN saturado con éter petróleo, tal y como se muestra en la **Figura I.2.7.**

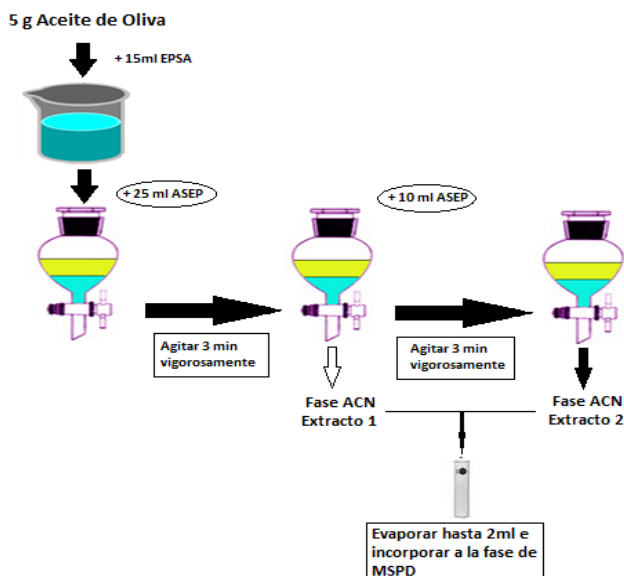


Figura I.2.7. Esquema de un procedimiento MSPD para el análisis de pesticidas en aceite de oliva. EPSA o Éter petróleo saturado con ACN y ASEP o Acetonitrilo saturado con Éter Petróleo.

La *MSPD* ofrece grandes ventajas frente a las técnicas clásicas de determinación de pesticidas, como la sencillez en las etapas de extracción y limpieza, no necesita aparatos costosos o sofisticados, la reducción en el

uso de disolventes tóxicos, bajo consumo de reactivos y además, genera pocos residuos.

También, el hecho de necesitar poca cantidad de muestra puede resultar ventajoso cuando la cantidad de muestra disponible no es excesiva, pero en muchos casos es una desventaja ya que limita la representatividad de la muestra.

Por otra parte, diversos estudios han confirmado los buenos porcentajes de recuperación obtenidos por este método en matrices grasas como el aceite de oliva^{186,234}. Sin embargo, la principal dificultad es la falta de automatización y el tiempo total de análisis.

1.2.2.4. Comparación de metodologías de extracción y purificación.

Aunque en la literatura han sido publicadas innumerables técnicas de extracción y purificación de pesticidas en aceite de oliva y aceitunas, las que mejores resultados han generado hasta la fecha han sido *GPC*, *QuEChERS* y *MSPD*.

La técnica de *GPC* aunque ofrece buenos resultados en términos de elevados porcentajes de recuperación y bajos *RSDs*, presenta el inconveniente de la gran cantidad de reactivos y disolventes que son consumidos durante la ejecución de la técnica así como el largo tiempo de análisis, incluyendo varios etapas analíticas que enlentecen la determinación de los analitos. Por todo ello, cada vez más los laboratorios

de análisis de residuos están poniendo a punto los procedimientos de *MSPD* y *QuEChERS*, ya que conllevan menor consumo de disolventes, etapas analíticas y reactivos, al mismo tiempo que ofrecen buenos porcentajes de recuperación.

Sin embargo, la elección de un método u otro dependerá de los pesticidas que se deseen determinar y el tipo de muestra. De este modo, en el caso de aceitunas y aceite de oliva han sido publicados algunos trabajos donde ambas técnicas de extracción han sido comparadas.

En el año 2008, *A. Krueve et al.*¹⁶¹ comparaban el efecto matriz que producen estas dos técnicas junto con el método Luke²³⁵ (método de extracción L-L que utiliza grandes volúmenes de acetona, diclorometano y éter petróleo) para la determinación de 14 pesticidas en diferentes matrices de frutas y vegetales. Los resultados mostraron que el método Luke generaba menor efecto matriz que los otros dos métodos, aunque si bien es cierto, no existieron muchas diferencias con respecto al método *QuEChERS*, el cual además fue más económico en términos de tiempo, número de etapas analíticas, y menor consumo de disolventes. Por otra parte, el método *QuEChERS* tiene la ventaja de lograr mayores rendimientos que los otros dos métodos de extracción. Según este trabajo, los bajos porcentajes de recuperación que fueron obtenidos a través de la extracción por *MSPD* fueron inaceptables para ser comparados con las otras dos técnicas. El motivo puede ser la adsorción irreversible de los pesticidas básicos en los grupos libres silanol del adsorbente.

Más tarde, en el año 2010, *B. Gilbert-López et al.* también compararon ambas metodologías para el análisis de más de 100 pesticidas presentes en muestras de aceitunas ²¹⁶ y aceite de oliva ²¹⁷. En el caso de las aceitunas, los resultados mostraron que el método *QuEChERS* era más apropiado para la extracción de gran cantidad de pesticidas en comparación con el *MSPD*, ya que los porcentajes de recuperación obtenidos eran sensiblemente superiores sobre muestras fortificadas a dos niveles de concentración obteniéndose valores entre 70-120% de recuperación global frente a los 50-70% obtenidos por *MSPD*. Además, en el método *QuEChERS* mostró unos valores de *RSDs* menores que en la aplicación *MSPD*. No obstante, el efecto matriz cuantificado por ambos métodos fue sensiblemente superior por el método *QuEChERS* y en la mayoría de los casos siempre con un efecto supresor, lo que evidencia la necesidad de utilizar este método siempre con patrones calibrados en matriz.

En el caso de la aplicación de estas dos metodologías en el aceite de oliva ²¹⁷, los resultados son opuestos a los encontrados en el caso de la comparación de ambos métodos en aceitunas, ya que dan lugar a efectos de la matriz de menor impacto pero en casi todos los casos con efecto de “*enhancement*” en lugar de supresión. Por otra parte, en general los porcentajes de recuperación son mayores por el método *QuEChERS*, aunque los *RSDs* son menores en el *MSPD*.

Aunque todo parece indicar que el método *QuEChERS* es más eficaz para extraer la mayor parte de los pesticidas presentes en la muestra, no

hay que olvidar que el método de elección siempre ha de ser elegido en función de la disponibilidad para realizar un método u otro en el laboratorio así como de los pesticidas que se desean determinar y la matriz que los contiene. Cabe destacar, por lo tanto, que existen pesticidas tan importantes como el Dimetoato, el Diuron o la TBA en los que no se pudieron encontrar porcentajes de recuperación satisfactorios, obteniéndose recuperaciones del orden de 143%, 54% o 123% respectivamente, aplicando el método *QuEChERS*. Un resumen de estos resultados puede verse en la **Tabla I.2.5.** obtenida a partir de los trabajos publicados por *B. Gilber-López et al.* en 2010.

Tabla I.2.5. Comparativa de los resultados obtenidos con dos procedimientos de análisis de pesticidas (*QuEChERS* y *MSPD*) para la determinación de los pesticidas Dimetoato, Diuron y TBA (artículos publicados por *Bienvenida Gilber-López et al.* en el año 2010^{216,217}).

PESTICIDAS	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	MATRIZ DE ACEITUNAS			MATRIZ ACEITE DE OLIVA		
		Efecto Matriz	% Recuperación		Efecto Matriz	% Recuperación	
			10ppb (RSDs)	100ppb (RSDs)		10ppb (RSDs)	100ppb (RSDs)
DIMETOATO	<i>QuEChERS</i>	-55%	92 (10)	92 (4)	9%	< LOD	143 (6)
	<i>MSPD</i>	-40%	66 (12)	55 (3)	5%	< LOQ	146 (6)
DIURON	<i>QuEChERS</i>	-75%	< LOD	105 (4)	13%	54 (10)	41 (5)
	<i>MSPD</i>	-67%	73 (8)	58 (7)	14%	124 (5)	121 (4)
TBA	<i>QuEChERS</i>	-54%	93 (2)	87 (3)	14%	123 (5)	107 (2)
	<i>MSPD</i>	-7%	73 (14)	54 (8)	8%	91 (8)	96 (8)

I.2.2.5. Métodos alternativos de determinación de pesticidas.

En los últimos años los métodos de análisis de pesticidas más generalizados han estado basados en la determinación por técnicas

cromatográficas (*GC* y *LC*) asociada a varios tipos de detectores como *MS*, *IT* o *TOF* o los cada vez menos utilizados *FID*, *NPD* o *ECD*. Sin embargo, estos métodos emplean mucho tiempo en el trabajo preparativo previo de las muestras así como en la extracción con disolventes o la limpieza de los extractos. Debido a ello, muchos autores han desarrollado nuevos procedimientos para determinar pesticidas de forma rápida y sencilla en diferentes matrices alimentarias. Entre ellas, destacan las técnicas inmunoquímicas del tipo *ELISA*, las cuáles han sido recientemente aplicadas al análisis de pesticidas en aceitunas y en el aceite de oliva²³⁶⁻²³⁹. Dichas técnicas han comenzado a dar buenos resultados para determinadas familias de pesticidas de modo que están ganando aceptación como simples y rentables métodos de barrido o “*screening*”.

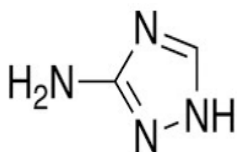
Para ello, realizan una extracción previa empleando metanol (1:1 v/v en el aceite de oliva) y a continuación, realizan un procedimiento de *clean up* por medio de congelación de los extractos a -80°C durante una hora. La fase metanólica resultante es diluida (1:25) previamente a su ensayo *ELISA*. Los resultados encontrados son equiparables a los encontrados con otros métodos de determinación de pesticidas basados en técnicas cromatográficas, logrando buenas determinaciones para residuos de Atrazina²³⁶ o Clorpirifos²³⁸ y alcanzando recuperaciones entre 71-115% para determinación multiresiduo de pesticidas organofosforados en aceite de oliva²³⁷ y triazinas en aceitunas²³⁹.

I.3. PESTICIDAS OBJETO DE ESTUDIO: AMITROL, CLORPIRIFOS, DIFLUFENICAN, DIMETOATO, DIURON, FOSMET, OXYFLUORFEN Y TERBUTILAZINA.

I.3.1. PESTICIDAS OBJETO DE ESTUDIO.

En la actualidad el número de pesticidas autorizados en el cultivo del olivar es muy amplio, por lo que también lo es el número de los que, potencialmente, pueden aparecer en aceitunas y aceites. Entre ellos, han sido objeto de estudio en esta tesis doctoral la determinación de cinco herbicidas como son el Amitrol, el Diuron, la Terbutilazina, el Oxyfluorfen y el Diflufenican, así como de tres insecticidas que son el Fosmet, Dimetoato y Clorpirifos, debido a que su uso es habitual en el cultivo del olivo y además, por la necesidad en la actualidad de una determinación conjunta de dichos plaguicidas. Una tabla resumen de las características físico-químicas más relevantes de estos pesticidas puede verse resumida en la **Tabla I.3.1.**

I.3.1.1. AMITROL: AMINOTRIAZOL o (3-AMINO-1, 2, 4-TRIAZOLE).



El Amitrol, también conocido como *aminotriazol*, es un herbicida no selectivo, el cual es ampliamente utilizado como sustituto de otros herbicidas peligrosos como por ejemplo, el Diuron. Un triazol es un compuesto químico isomérico que consta de un anillo aromático de 5 miembros que contiene 3 átomos de

nitrógeno en las posiciones 1, 2, 3 o bien en las posiciones 1, 2, 4 y dos átomos de carbono, siendo su fórmula molecular $C_2H_3N_3$. Por lo tanto, el Amitrol es un triazol cuya fórmula es $C_2H_4N_4$.

Este herbicida, aunque es potencialmente carcinogénico, tiene baja toxicidad en mamíferos. Debido a su gran solubilidad en agua, puede ocurrir que pase por lixiviación al suelo, generando una contaminación de las aguas subterráneas.

Debido a su gran polaridad, y en muchos casos a su carácter iónico, la cromatografía iónica es generalmente el método elegido para determinarlo. La cromatografía de gases se usa generalmente para el análisis de pesticidas volátiles, debido a su elevada resolución y eficiente identificación. No obstante, el Amitrol es térmicamente degradable por lo que no puede ser directamente analizado por GC-MS. Además, debido a su gran carácter polar la separación cromatográfica por GC o LC es solo posible tras derivatización.

Como este herbicida es muy soluble en muestras acuosas para su determinación se han desarrollado varios métodos HPLC en fase reversa con derivatización *pre-columna* y detector *UV* o de fluorescencia, aunque también han sido descritos métodos en fase normal o incluso electroforesis capilar^{128,240-247}.

En el 1997 *García Sánchez et al.*²⁴⁷ propusieron un método rápido de determinación del Amitrol (menos de 15 min), obteniendo porcentajes de

recuperación entre 90-118% y un LOD de $0,75\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a través de una derivatización del herbicida con *fluorescamina* y empleando un sistema HPLC con detector de fluorescencia.

Más tarde, en el año 2001 *Bobeldijk et al.*²⁴¹ con el fin de poder alcanzar menores límites de detección (LOD), desarrollaron un nuevo método de derivatización de los grupos amino del Amitrol en muestras de agua obteniendo LOD de $0.025\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

El método consistía en una extracción en fase sólida *on-line* (SPE) y una separación *RP-HPLC* seguida de detección por fluorescencia o *MS*. El mecanismo propuesto consiste en derivatizar el Amitrol con *FMOC-Cl* para dar un derivado cuya masa molecular era de 306 g/mol . El método descrito obtuvo recuperaciones para el agua potable del 95% ($RSDs < 9\%$) y del 75% en aguas superficiales ($RSDs < 12\%$) en muestras fortificadas a $0.1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Amitrol. Un resumen de las principales técnicas de extracción y métodos de determinación del Amitrol pueden verse en la **Tabla I.3.2**.

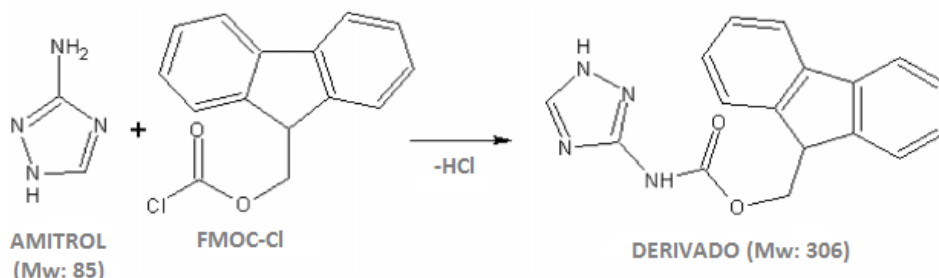


Tabla I.3.2. Principales métodos de determinación del Amitrol descritos en la literatura.

MATRIZ	EXTRACCIÓN	DERIVATIZACIÓN	ANÁLISIS	LOD (ppb)	%REC. (RSDs)	REF.
AGUA	SPE (Extracción en fase sólida)	FMOC-Cl	rHPLC-MS/MS	0,025	95 (<9)	241
AGUA	Evaporación e inyección directa	NO	ECZ-UV	4,0	110 (<6)	242
AGUA	Concentración <i>on-line</i> con adición de fórmico	NO	EC-MS	130,0	-----	243
AGUA	NO	NO	nHPLC-MS/MS	1,4-4,0	-----	244
AGUA DE GRIFO	Las muestras fueron filtradas 0.45µm previa derivatización para eliminar posibles partículas en suspensión.	Pre-Columna con CNBF ^a	HPLC	160,0	94-99.0 (<6)	245
AGUA DE ESTANQUE					92-100,2(<4)	
AGUA DE RIO					98-103,0(<6)	
AGUA SUPERFICIAL	DISCOS SDB-RPS ^b	NO	HPLC-EC ^c	30,0	99,4 (<12)	246
ACEITE DE OLIVA	Extracción con hexano y mezcla ACN:agua al 1% fórmico	NO	rHPLC-MS/MS	60,0	82-95 (<5)	128

^a CNBF: 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro; ^b SDB-RPS: discos de membrana sulfonada en fase reversa de poliestireno divinilbenceno; ^c HPLC-EC: HPLC con detector electroquímico (amperométrico).

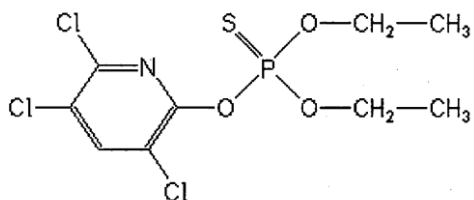
I.3. Pesticidas objeto de estudio.

Tabla I.3.1. Resumen de las principales características físico-químicas de los pesticidas objeto de estudio.

	AMITROL	DIFLUFENICAN	DIURON	TERBUTILAZINA
Fórmula	C ₂ H ₄ N ₄	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	C ₉ H ₁₀ C ₁₂ N ₂ O	C ₉ H ₁₆ ClN ₅
Peso Molecular	84.08	394.07	233.10	229.70
Presión de vapor (mm Hg)	225.01 (a 0°C)	32.00	2.90·10 ⁻⁹	1.12·10 ⁻⁶ (a 25°C)
Solubilidad (g/L)	280	1175	0.0364	0.0085
Cte. Reparto (log K_{o/w})	-0.97	4.9	2.7	2.8
Vida Media en Agua (días)	30 días	4-5 meses (suelos arcillosos)	Altamente Persistente (1año)	30-90 (suelo)
REFERENCIAS	64	248	248	249
	OXYFLUORFEN	DIMETOATO	FOSMET	CLORPIRIFOS
Fórmula	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	CH ₃ NHCOCH ₂ SPS(OCH ₃) ₂	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Peso Molecular	361.70	229.00	317.32	350.60
Presión de vapor (mm Hg)	2.48·10 ⁻⁷ (a 25°C)	8.25·10 ⁻⁶ (a 25°C)	4.90·10 ⁻⁷ (a 25°C)	2.03·10 ⁻⁵ (a 25°C)
Solubilidad (g/L)	0.000116	25	0.0244	0.0014
Cte. Reparto (log K_{o/w})	4.7	0.5-0.78	2.78	4.96
Vida Media en Agua (días)	30-40 (suelo)	2-120 (suelo) u 8 (agua)	4-20 (suelo)	4 (agua) o 48 (suelos arenosos)
REFERENCIAS	248,250	248,250,251	248,250	250,252

I.3.1.2. CLORPIRIFOS U *O, O*-dietil *O*-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato.

El Clorpirifos, *O, O*-dietil *O*-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato (IUPAC) u *O, O*-dietil *O*-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato (CAS) es un insecticida organofosforado sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte. No es muy soluble en agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o a animales.



El Clorpirifos se ha usado ampliamente en viviendas y en agricultura para controlar cucarachas, pulgas, y termitas, así como en ciertos collares de animales domésticos para controlar pulgas y garrapatas.

Su inhalación o ingestión puede producir gran variedad de efectos sobre el sistema nervioso, incluyendo dolores de cabeza, visión borrosa, lagrimeo, excesiva salivación, secreción nasal, mareo, confusión, debilidad o temblores musculares, náuseas, diarrea y cambios bruscos en el latido del corazón.

El efecto depende de la cantidad de Clorpirifos en el aire y de la duración de la exposición, produciendo a altos niveles pérdida del conocimiento (coma) o incluso, la muerte.

No se sabe si el Clorpirifos produce cáncer en seres humanos ya que los estudios en animales no lo han demostrado y por ello la EPA lo ha clasificado como *posiblemente* carcinogénico en seres humanos ²⁵³.

La Administración de Alimentos y Drogas (FDA) ha establecido límites de tolerancia para el Clorpirifos en productos agrícolas de 0.05 a 15ppm en alimentos. Los principales trabajos de determinación de este insecticida pueden verse resumidos en la **Tabla III.3**.

Tabla I.3.3. Principales técnicas de determinación del Clorpirifos en diferentes matrices.

MATRIZ	EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN	ANÁLISIS	LOD (ppb)	% RECUPERACION (RSDs)	REF
Aceitunas	Éter petróleo + Ultraturax y GPC.	GC-TSD	0.50	96 (14)	108
Aceite Oliva Virgen/Refinado	Extracción con hexano y ACN + GPC.	GC-MS/MS	0.30	84-103 (4)	109
Bananas	QuEChERS tampón citrato.	GC-NPD	24.0	103-116 (<12)	79
Agua de Lavado aceitunas	SPE (Extracción en fase sólida) C ₁₈ y diclorometano.	GC-TSD	0.001	84 (<7)	169
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + GPC.	GC-MS/MS	0.30	89-101 (<4)	254
Aceite de Oliva	Extracción con ACN saturado en n-hexano + GPC.	GC-TSD	2.0	97 (<14)	182
		GC-MS/MS	0.2	105 (<11)	
Zumo de manzana	MSPD (mezcla hexano:diclorometano)	GC-MS/MS	7.0	103 (<7)	229
Rábano/ Repollo	QuEChERS (método modificado con refrigeración de extractos)	GC-MS/MS	0.003	Rábano: 82-90 (<8) Repollo: 82-92 (<6)	197

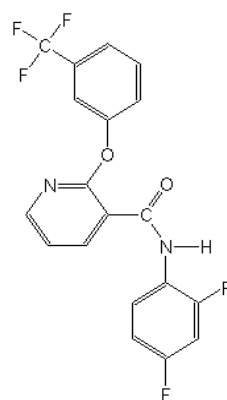
I.3. Pesticidas objeto de estudio.

Vino	3 Procedimientos evaluados: <i>QuEChERS</i> con o sin tampón citrato y sin <i>clean up</i> .	GC-MS/MS	<i>n.d.</i>	Tinto: 81 (4) Blanco: 88 (2) Rosado: 91 (7)	255
Cereales y Piensos	<i>QuEChERS</i> tampón citrato optimizado.	GC-MS/MS	<i>n.d.</i>	94 (<10)	256
Frutas y Verduras	<i>QuEChERS</i> tampón acetato y sin tamponar.	LP-GC-TOF-MS (low P)	10.0	92 (<9)	257
Frutas y Verduras	<i>QuEChERS</i> y <i>clean up</i> sin C ₁₈ .	GC-MS	<i>n.d.</i>	89-95 (<6)	258
Aceite Oliva	<i>LLE</i> con n-hexano y ACN + 2 <i>clean up</i> (ENVI Carb + Diol SPE)	GC-NPD	2.40	84-107 (<13)	250
Arroz	<i>QuEChERS</i> (<i>clean up</i> sin C ₁₈) y control de la T ^a durante la preparación de la muestra.	GC-MS	0.003	96-101 (<9)	259
Miel / Zumos	<i>SPME</i> fiber a través del mecanismo <i>sol-gel</i>	GC-FPD	0.005 0.004	105 (<7) 96 (<6)	260
Papillas de frutas	1. <i>QuEChERS</i> (tampón acetato) 2. <i>Extracción</i> con <i>EtOAc</i> + <i>GPC</i> .	PTV-LP-GC-HR-TOF-MS	2.5	1. 84 (13) 2. 104 (6)	261
Te Chino	<i>LLE</i> con ACN-EtOAc-hexano + <i>GPC</i> y <i>SPE</i> como <i>clean up</i> .	GC-MS	<62	64-83 (<14)	262
Zumo manzana	<i>DLLME</i> (dispersive liquid-liquid microextraction).	mGC-MS	1.44	66-99 (<6)	263
Carne de Ternera	<i>ASE</i> (accelerated solvent extraction) con ACN + <i>GPC</i> .	GC-MS	3.2	75-83 (<15)	264
Agua	<i>SPE</i> (columnas Oasis HLB).	LC-MS/MS	0.039	45-48 (<4)	265

I.3.1.3. DIFLUFENICAN o *N*-(2,4-difluorofenil)-2-[3-(trifluorometil)fenoxi]piridina-3-carboxiamida.

El Diflufenican es un herbicida *pre-emergente* que se utiliza en el control de las malas hierbas. Su fórmula química es $C_{19}H_{11}F_5N_2O_2$ y su nombre IUPAC es *2',4'-difluoro-2-(α,α,α -trifluoro-*m*-toliloxi)nicotinánilida*.

Este herbicida actúa inhibiendo la síntesis de los carotenoides en las plantas causando decoloración de las partes aéreas nuevas del tallo emergente. Tiene una elevada persistencia en el suelo tras su aplicación, ya que es débilmente volátil y persiste en los 10 primeros centímetros del suelo, por lo que pueden quedar sus residuos en los alimentos cultivados. Aunque es posible que genere irritación de las mucosas de ojos y nariz (no de la piel), estudios en animales demostraron que el Diflufenican no es mutagénico, carcinogénico o teratogénico y no presenta efectos en la reproducción, aunque es muy tóxico para los organismos acuáticos ²⁶⁶.



El LMR para el Diflufenican fue actualizado por el REGLAMENTO (UE) Nº 897/2012 DE LA COMISIÓN de 1 de octubre de 2012 por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) n o 396/2005 ¹⁸⁰ del Parlamento Europeo y del Consejo, con respecto a los límites máximos de residuos de Acibenzolar-S-metilo, Amisulbrom, Ciazofamida, Diflufenican, Dimoxistrobina, Metoxifenocida y nicotina en determinados productos,

entre ellos las aceitunas para elaboración de aceite de oliva, donde ha sido establecido un LMR de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

La técnica habitual de determinación del Diflufenican es la GC utilizando diferentes detectores como el espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo ^{109,207,255} o TOF ²⁶⁷, aunque este herbicida presenta baja volatilidad.

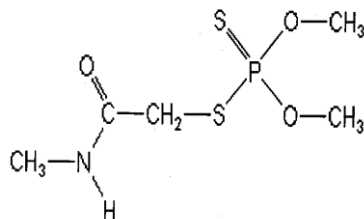
En los últimos años, se han propuesto métodos para la determinación de Diflufenican basados en LC-MS ^{268,269} dando mejores resultados que con GC. No obstante, este herbicida no es compatible con el GCB en los tratamientos de purificación ²⁵⁵. Un resumen de las diferentes alternativas para la determinación de este herbicida puede verse en la **Tabla I.3.4.**

Tabla I.3.4. Principales técnicas de determinación del Diflufenican en diferentes matrices.

MUESTRA	EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN	ANÁLISIS	LOD (ppb)	%REC. (RSDs)	REF.
Aceite de Oliva Virgen y Refinado	Extracción con hexano y ACN + GPC	GC-MS/MS	0.100	84-109 (<5)	109
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + GPC.	GC-MS/MS	0.100	94-108 (<4)	254
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + Florisil.	GC-MS/MS	-----	90 (10)	184
Tomate	QuEChERS (método citrato)	GC-MS/MS	No	98-103 (<15)	207
Agua	SPE (Extracción en fase sólida)	GC-TOF-MS	0.020	-----	267
Agua	SPE (Extracción en fase sólida)	UPLC-MS/MS	0.005	74 (<5.3)	268
Frutas y Verduras	QuEChERS (sin PSA en el clean-up)	UPLC-TOF-MS	-----	-----	269
Vino	3 Procedimientos evaluados: QuEChERS con o sin tampón citrato y sin clean up.	GC-MS/MS	No	Tinto: 89 (4) Blanco: 90 (3) Rosado: 97(3)	255
Matrices acuáticas	Agua: SPE Sedimento y Músculo de pescado: extracción sólido-líquido con Ultraturrax y MgSO ₄	LC-MS/MS	No	Agua: 60 (4) Sedimento: 35 (25) Músculo de Pescado: 36 (21)	270
Leche	Extracción con ACN y Na ₂ SO ₄ + ultrasonidos. Clean up con SPE C ₁₈	LC-MS/MS	0.300	80-86 (<9)	271
Cereales y Piensos	QuEChERS tampón citrato optimizado.	GC-MS/MS	No	103 (10)	256
Frutas y verduras	Extracción con acetato de etilo y dope con PSA y/o C ₁₈ y GCB.	GC-MS/MS	No	No (Procedimiento Semicuantitativo)	272

I.3.1.4. DIMETOATO o 2-dimetoxifosfinitioiltio-N-metilacetamida.

El Dimetoato, 2-dimetoxifosfinitioiltio-N-metilacetamida (IUPAC) o *O,O*-dimetil S-[2-(metilamino)-2-oxoetil] fosforoditioato (CAS) es un insecticida organofosforado sistémico y de contacto ampliamente usado para matar ácaros e insectos. Fue patentado y presentado en 1950 por *American Cyanamid* e al igual que otros organofosforados actúa desactivando la *colinesterasa*, una enzima esencial para la función del sistema nervioso central.



El Dimetoato se utiliza contra una amplia gama de insectos, como los saltamontes y moscas blancas en plantas ornamentales, alfalfa, manzanas, maíz, algodón, uvas, limones, melones, naranjas, peras, nueces, girasol, sorgo, soya, mandarinas, tabaco, tomate, sandía, trigo y otros vegetales. Además, ha sido administrado también en animales para el control de los moscardones.

En cuanto a su toxicidad, el Dimetoato es moderadamente tóxico por ingestión, inhalación y absorción dérmica, ya que como todos los organofosforados es fácilmente absorbido por la piel. En general, los organofosforados se absorben fácilmente a través de los pulmones por lo que las personas con enfermedades respiratorias o personas con mal funcionamiento del hígado pueden estar en mayor riesgo de exposición.

Las altas temperaturas o la exposición a la luz visible o ultravioleta pueden aumentar su toxicidad.

La determinación del Dimetoato en diferentes matrices alimentarias está muy extendida, sobretodo empleando métodos de extracción como el *QuEChERS* y *MSPD*, y detección por GC-MS. (Tabla I.3.5.).

Tabla I.3.5. Principales técnicas de determinación del Dimetoato en diferentes matrices.

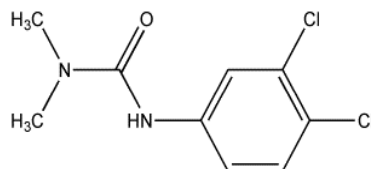
MATRIZ	EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN	ANÁLISIS	LOD (ppb)	%REC. (RSDs)	REF
Aceitunas	Extracción usando éter petróleo + Ultraturrax y GPC como clean up.	GC-TSD	1.25	114 (<11)	108
Aceite de Oliva Virgen y Refinado	Extracción con hexano y ACN + GPC	GC-MS/MS	0.3	93-100 (4)	109
Agua de Lavado aceitunas	SPE con C ₁₈ y diclorometano.	GC-TSD	0.001	74 (<4)	169
Aceite de Oliva	Extracción con ACN saturado en <i>n</i> -hexano + GPC.	GC-MS/MS	0.3	101-109 (<5)	254
Aceite de Oliva	Extracción con ACN saturado en <i>n</i> -hexano + GPC.	GC-TSD GC-MS/MS	5.0 10.0	97 (11) 102 (11)	182
Aceitunas y Aceite de Oliva	MSPD con aminopropil (extracción L-L preliminar) y clean up con <i>Florisil</i> .	LC-MS/MS	4.0 3.0	Aceitunas: 88-95(<8) Aceite: 83-91(<9)	186
Zumo de manzana	MSPD (mezcla hexano:diclorometano)	GC-MS/MS	4.0	101.0 (5.9)	229
Fruta	UA-MSPD (Ultrasonic assisted matrix solid phase dispersion) con C ₈ y <i>AcEt</i> .	GC-MS	20.5	70-90 (<12)	85

I.3. Pesticidas objeto de estudio.

Rábano/ Repollo	<i>QuEChERS</i> (método modificado con refrigeración de extractos)	GC-MS/MS	0.01	Rábano: 80-93 (<8) Repollo: 102-110 (<6)	197
Te	<i>QuEChERS</i> (tampón acetato con refrigeración de extractos)	UPLC-MS/MS	<5.0	62-88 (<15)	244
Vino	3 Procedimientos evaluados: <i>QuEChERS</i> con o sin tampón citrato y sin <i>clean up</i> .	GC-MS/MS	No	Tinto: 73 (11) Blanco: 90 (14) Rosado: 88 (17)	255
Cereales y Piensos	<i>QuEChERS</i> tampón citrato optimizado.	GC-MS/MS	No	105 (13)	256
Aceite de Palma	Extracción L-L con precipitación a baja temperatura y <i>MSPD</i> .	LC-TOF-MS	3.5	78-105 (<14)	273
Frutas y Verduras	<i>QuEChERS</i> (clean up sin C_{18}).	GC-MS	<i>n.d.</i>	77-93 (<29)	258
Aceite Oliva	<i>LLE</i> con n-hexano y ACN + 2 clean up (ENVI Carb + Diol SPE)	GC-NPD	1.5	92.2-101.0 (<11)	250
Arroz	<i>QuEChERS</i> (clean up sin C_{18}) y control de la T^a durante la preparación de la muestra.	GC-MS	0.01	91-113 (<8)	259
Miel/ Zumos	<i>SPME</i> fiber a través del mecanismo <i>sol-gel</i>	GC-FPD	0.7 0.2	74.4 (15) 80.1 (9.2)	260

I.3.1.5. DIURON o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea.

La molécula de Diuron ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$) pertenece al grupo de herbicidas derivados de la urea conocidos como fenilureas. Las



fenilureas se emplean mayormente en los cultivos de raíces profundas, perennes, en los que resultan muy fitotóxicas para otras plantas jóvenes

que se deben desarrollar a partir de semillas, que germinan en la zona donde se realiza el tratamiento con el herbicida ²⁷⁴.

Tras su aplicación, el Diuron se adsorbe en el suelo donde puede perdurar hasta incluso once meses. Se lo considera tóxico para el ser humano, ya que provoca irritación en piel y mucosas al contacto directo. Es un carcinógeno comprobado y tiene efectos contaminantes en el medio ambiente.

El Diuron se emplea como herbicida *pre-emergente* en cultivos tales como espárragos, cítricos, algodón, y también en viñedos y olivos.

En la literatura se han descrito diversos métodos cromatográficos para su determinación empleando diferentes sistemas de detección. Así, se han propuesto métodos basados en cromatografía líquida con detección UV ²⁷⁵, MS/MS ^{268,276,277}, APCI/MS ^{278,279} y ESI/MS²⁸⁰⁻²⁸².

También se han descrito métodos que emplean la cromatografía de gases con detectores selectivos como el ECD ^{108,169,182} o el de MS¹⁰⁹. El método de extracción más habitual en los últimos años ha sido el método *QuEChERS* ^{144,198,199,205,216,217,220} (ver resumen en **Tabla I.3.6.**).

Tabla I.3.6. Diferentes métodos de determinación del Diuron en diferentes matrices.

MATRIZ	EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN	ANÁLISIS	LOD (ppb)	%REC. (RSDs)	REF.
Aceitunas	Extracción usando éter petróleo + Ultraturrax y GPC como clean up.	GC-ECD	2.5	117 (14)	108
Aceite de Oliva Virgen y Refinado	Extracción con hexano y ACN + GPC	GC-MS/MS	0.3	94-104 (4)	109
Zumos Frutas	QuEChERS tampón acetato.	UPLC-MS/MS	1.5	79-91 (<19)	151
Agua de Lavado aceitunas	SPE (Extracción en fase sólida) C ₁₈ y diclorometano.	GC-ECD	0.002	102 (13)	169
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + GPC.	GC-MS/MS	0.2	97-108(<4)	176
Aceite de Oliva	Extracción con ACN saturado en n-hexano + GPC.	GC-ECD GC-MS/MS	10 0.5	116 (6) 98 (7)	182
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + Florisil.	GC-MS/MS	No	102 (<8)	184
Agua	SPE (Extracción en fase sólida)	UPLC-MS/MS	0.007	93.7 (4)	268
Frutas y Verduras	QuEChERS (sin PSA en el clean-up)	UPLC-TOF-MS	-----	-----	269
Leche	Extracción con ACN y Na ₂ SO ₄ + ultrasonidos. Clean up con SPE C ₁₈ .	LC-MS/MS	2.9	73-80 (<13)	271
Vegetales de hoja verde y Arroz	MSPD (Matrix Solid-Phase Dispersion) y Electroforesis Capilar.	MSPD-CE-ECD*	15	Vegetal: 78-81 (<8) Arroz : 81-85 (<7)	275
Agua	SPE (Extracción en fase sólida) columnas OASIS HLB (200mg).	UPLC-MS/MS	0.016	70.9-89.8 (<11)	276

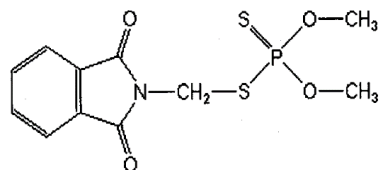
I.3. Pesticidas objeto de estudio.

Limón y Pasas de Corinto	Extracción con MetOH:agua 80:20 (v/v) + 0.1% fórmico.	UPLC-MS/MS	No	Limón: 72-73 (<8)	277	
Agua	SPE (Extracción en fase sólida) con tres tipos de columnas.	LC-ESI-MS	No	Grifo	PS2: 124 (2)	278
				C ₁₈ : 131 (11)		
				OASIS: 115 (1)		
				PS2: 125 (2)		
	Río	C ₁₈ : 133 (3)		OASIS: 107 (6)		
Frutas y Verduras	Extracción Sólido-Líquido con Acetato de Etilo + Polytron.	LC-MS/MS	0.380	87-91 (<14)	279,280	
Zumo Naranja	Extracción por el sistema HF-MMLE (simultaneous application of L-L microextraction and microporous membrane SPE)	LC-MS/MS	30	Cartón: 85-121 (11.3)	281	
			8	Cartón Light: 79-121		
			29	Fresco: 75-120		

*Electrocheminlumescence detection.

I.3.1.6. FOSMET U *O,O*-dimetil *S*-ftalimidometil fosforoditioato

El Fosmet, *O,O*-dimetil *S*-ftalimidometil fosforoditioato (IUPAC) o *N*-(dimetoxifosfinotioiltiometil)ftalimida es un insecticida organofosforado derivado de ftalimida, no sistémico, usado en plantas y animales. Se utiliza principalmente en los manzanos aunque también se utiliza en una amplia gama de cultivos de frutas, plantas ornamentales y vides para el control de áfidos, chupadores, ácaros y moscas de la fruta.



El Fosmet es un compuesto moderadamente tóxico por ingestión y altamente tóxico por otras vías de exposición. Tiene una toxicidad moderadamente alta a través de la piel y una alta toxicidad por inhalación.

Al igual que otros organofosforados es un inhibidor de la enzima *colinesterasa*. Los síntomas de intoxicación aguda por Fosmet incluyen náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea. La exposición aguda a altas concentraciones puede resultar en espasmos musculares, pérdida de coordinación muscular, confusión mental y somnolencia. El insecticida también puede repercutir negativamente en la respiración y la salivación. Los signos de intoxicación aguda son rápidos, por lo general ocurren dentro de los 30min después de la exposición. El compuesto parece ser más tóxico en animales domésticos como vacas, ovejas y cabras que a los roedores. Los valores de la DL_{50} para estos animales van desde 25 a 50 mg/kg.

Como ocurre en el caso del Dimetoato, la determinación del Fosmet en diferentes matrices alimentarias está muy extendida, y podemos encontrar innumerables trabajos de determinación de este plaguicida en la literatura, aunque si bien es cierto, la mayoría de ellos en los últimos años se han basado en extracción con el método *QuEChERS* o por *MSPD*, y detección por GC-MS. (**Tabla I.3.7.**).

Tabla I.3.7. Principales métodos de determinación del Fosmet en diferentes matrices.

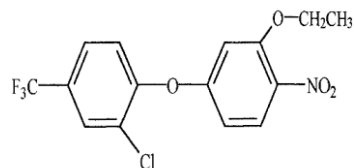
MATRIZ	EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN	ANÁLISIS	LOD (ppb)	%REC. (RSDs)	REF
Aceite de Oliva Virgen y Refinado	Extracción con hexano y ACN + GPC	GC-MS/MS	0.10	90-104 (<5)	109
Bananas	QuEChERS tampón citrato.	GC-NPD	62.0	70-85 (<12)	79
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + GPC.	GC-MS/MS	0.10	96-107 (4)	176
Aceitunas	MSPD y clean up con C ₁₈ y ACN.	GC-MS	60.0	73-85 (<9)	234
Rábano/ Repollo	QuEChERS (método modificado con refrigeración de extractos)	GC-MS/MS	0.015	Rábano: 88-90 (<11) Repollo: 86-112 (<10)	197
Vino	3 Procedimientos evaluados: QuEChERS con o sin tampón citrato y sin clean up.	GC-MS/MS	No	Tinto: 86 (5) Blanco: 89 (4) Rosado: 90 (3)	255
Cereales y Piensos	QuEChERS tampón citrato optimizado.	GC-MS/MS	n.d.	95 (10)	256
Frutas y Verduras	QuEChERS tampón acetato y sin tamponar	LP-GC-TOF-MS (low P)	10-25	99 (<24)	257
Aceite Oliva	LLE con n-hexano y ACN + 2 clean up (ENVI Carb + Diol SPE)	GC-NPD	13.1	94.2-96.0 (<11)	250
Arroz	QuEChERS (clean up sin C ₁₈) y control de la Tª durante la preparación de la muestra.	GC-MS	0.015	84-112 (<7)	259
Papillas de frutas	1. QuEChERS (tampón acetato) 2. Extracción con EtOAc + GPC.	PTV-LP-GC-HR-TOF-MS	2.5	1. 76 (17) 2. 94 (8)	261
Te Chino	LLE con ACN-EtOAc-hexano + GPC y SPE como clean up.	GC-MS	<57	90-122 (<14)	283

I.3. Pesticidas objeto de estudio.

Zumo manzana	<i>DLLME</i> (dispersive L-L microextraction).	mGC-MS	1.34	63-101 (<6)	262
Frutas y Zumos de frutas	<i>ELISA</i> y extracción a partir de metanol.	HPLC-UV	0.6	80-102 (<14)	263
Carne de Ternera	<i>ASE</i> (accelerated solvent extraction) con ACN + <i>GPC</i> .	GC-MS	0.5	78-84 (<7)	264
Agua	<i>SPE</i> (columnas Oasis HLB).	LC-MS/MS	0.019	88-98 (<12)	265
Agua Corriente	<i>D-μSPE</i> (con ionic liquid-modified silica).	UPLC-DAD ($\lambda=223$ nm)	0.295	86-90 (<5)	284

I.3.1.7. OXYFLUORFEN o 2-cloro- α, α, α -trifluoro-p-tolil 3-ethoxy-4-nitrophenyl ether

El *Oxifluorfen*, 2-cloro- α, α, α -trifluoro-p-tolil 3-etoxi-4-nitrofenil eter (IUPAC) o 2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-(trifluorometil)benzeno (CAS), es un herbicida selectivo de *pre* y *post emergencia* temprana de aspecto sólido cristalino que va de color blanco a anaranjado o café rojizo.



Es moderadamente persistente en los sistemas terrestres, con un vida media representativa de 30-40 días. Se adsorbe en la mayoría de los suelos, sobre todo en aquellos con altos contenidos de materia orgánica y arcilla. En las plantas tratadas prácticamente no se moviliza, no es metabolizado, ni absorbido a través de las raíces. Su toxicidad aguda no es significativa, pero sus efectos crónicos y subcrónicos pueden ser importantes para

especies terrestres de pájaros y mamíferos, al generar daños en la reproducción y desarrollo (malformaciones).

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima *fotoporfirinógeno oxidasa* que está involucrada en la síntesis de la clorofila en las plantas. Esta enzima también está presente en los animales, donde participa en la síntesis del grupo *hemo*, componente principal de la hemoglobina. Por ello, el Oxifluorfen puede producir anemia y hemólisis en animales expuestos e incluso algunos estudios con animales de laboratorio muestran que puede producir cáncer en el hígado ²⁸⁵.

La determinación del Oxifluorfen en matrices alimentarias (**Tabla I.3.8.**) se realiza habitualmente por GC acoplada a detectores de masas, bien a partir de analizadores de cuadrupolo o bien por tiempo de vuelo. La determinación del Oxifluorfen por LC-MS es menos frecuente debido a que *LODs* alcanzados por este procedimiento son muy elevados en comparación con los obtenidos por otras técnicas como GC-MS.

Tabla I.3.8. Principales técnicas de determinación del Oxifluorfen en diferentes matrices.

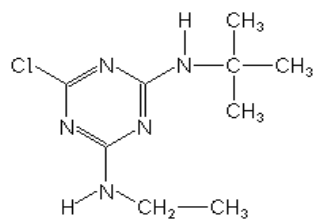
MATRIZ	EXTRACCIÓN/ PURIFICACIÓN	ANÁLISIS	LOD	%REC. (RSDs)	REF.
Aceite de Oliva Virgen y Refinado	Extracción con hexano y ACN + GPC	GC-MS/MS	0.7	96-99 (<4)	109
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + GPC.	GC-MS/MS	0.7	95-101 (<4)	176
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + Florisil.	GC-MS/MS	<i>n.d.</i>	98 (<11)	184

I.3. Pesticidas objeto de estudio.

Zumo de manzana	<i>MSPD</i> (mezcla hexano:diclorometano)	GC-MS/MS	5.0	95.2 (7.7)	229
Rábano/ Repollo	<i>QuEChERS</i> (método modificado con refrigeración de extractos)	GC-MS/MS	< 0.1	85-104 (<7) 93-106 (<6)	197
Tomate	<i>QuEChERS</i> (método citrato)	GC-MS/MS	No	100-104 (<7)	207
Frutas y Verduras	<i>QuEChERS</i> tampón acetato y sin tamponar	LP-GC-TOF-MS (low pressure)	< 10	101 (<13)	257
Bebidas a base de frutas	HS-SPME (Headspace Solid-Phase MicroExtraction).	GC-MS	0.001	89 (<15)	286
Agua Río	<i>SPE</i> con Carbograph-1 y diclorometano:metanol (80:20) + fórmico,	RP-HPLC-DAD LC-MS/MS	0.032 0.017	96 (<5.5) 90 (< 10.5)	287
Frutas y Verduras	<i>QuEChERS</i> + clean up sin C ₁₈ .	GC-MS	<i>n.d.</i>	86.5 (<11)	258
Cebollas	Pretratamiento para inactivar la enzima allinasa por microondas + Extracción con ACN.	GC-MS/MS	3.0	89.8-96.7 (<6)	288
Aceite Oliva	<i>LLE</i> con n-hexano y ACN + 2 clean up (ENVI Carb + Diol <i>SPE</i>)	GC-ECD	1.4	99.9-101.0 (<8.3)	250
Pimienta/ Tomate	Extracción con Acetona y homogenización	GC-NPD (GC-MS confirmation)	2.1-2.8 2.3	75.8-88.1 (<5) 76.5 (<5)	289
Arroz	<i>QuEChERS</i> (clean up sin C ₁₈) y control de la Tª durante la preparación de la muestra.	GC-MS	0.010	84-98 (<6)	259
Bananas	<i>DLLME</i> (dispersive liquid-liquid microextraction) usando un líquido iónico a Tª ambiente.	HPLC-DAD	1.35	82-85 (<7)	290

I.3.1.8. TERBUTILAZINA o 6-cloro-N-(1, 1-dimetiletil)-N'-etil-1, 3, 5-triazina-2,4-diamina.

La Terbutilazina (TBA) es un herbicida perteneciente a la familia de las cloro-triazinas, con fórmula molecular de $C_9H_{16}ClN_5$. Este herbicida actúa como inhibidor de la fotosíntesis



de las plantas, y debido a su modo de acción puede ser utilizado en el control de las malas hierbas como *pre* y *post emergencia*. Se trata de un herbicida selectivo para diferentes cultivos tales como el olivo, el maíz, sorgo, patatas, viñedos, cítricos o café y es particularmente efectivo contra dicotiledóneas anuales ²⁸².

Este herbicida puede dar lugar a irritación de la piel y mucosas a bajas dosis y obstrucción del tracto respiratorio en altas, siendo por ello importante su determinación en los alimentos, a fin de prevenir riesgos para la salud humana.

Actualmente existen muchos métodos para la determinación de la TBA en matrices alimentarias, así como en aguas superficiales y subterráneas. Como en los casos anteriores, los métodos de extracción en los últimos años han sido basados en el procedimiento *QuEChERS* con detección cromatográfica, aunque existen otras metodologías. En la **Tabla III.9** se puede ver un resumen de los procedimientos más empleados en la determinación de la TBA en matrices alimentarias.

Tabla I.3.9. Resumen de las principales técnicas de determinación de la TBA en diferentes matrices.

MATRIZ	EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN	ANÁLISIS	LOD	% REC. (RSDs)	REF.
Frutas	UA-MSPD (Ultrasonic assisted matrix solid phase dispersion) con C ₈ y AcEt.	GC-MS	3.8	75-126 (<7)	85
Aceite de Oliva Virgen y Refinado	Extracción con hexano y ACN + GPC	GC-MS/MS	0.2	96-109 (5)	109
Zumos Frutas	QuEChERS tampón acetato.	UPLC-MS/MS	1.7	82-87 (<12)	151
Agua de Lavado aceitunas	SPE (Extracción en fase sólida) C ₁₈ y diclorometano.	GC-TSD	0.001	97 (<7)	169
Aceitunas y Aceite de Oliva	MSPD con aminopropil (extracción L-L preliminar) y <i>clean up</i> con Florisil.	LC-MS/MS	0.4 0.2	Aceitunas: 86-108 (<10) Aceite: 96-103 (<6)	186
Trigo, Pepino, Vino Tinto.	QuEChERS tampón acetato.	UHPLC-MS/MS		Trigo: LOD < 4.5; 77 (<15) Pepino: LOD < 4.2; 104 (<8) Vino Tinto: LOD < 5; 93 (<4)	199
Agua	SPE (Extracción en fase sólida)	UPLC-MS/MS	0.006	99 (<3)	268
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + GPC.	GC-MS/MS	0.2	97-106 (4)	176
Agua	SPE (Extracción en fase sólida) columnas OASIS HLB (200mg).	UPLC-MS/MS	0.007	84 (<11)	276
Aceitunas	Extracción con éter petróleo + Ultraturax y GPC como <i>clean up</i> .	GC-TSD	0.5	96 (<10)	108
Aceite de Oliva	Extracción con ACN saturado en <i>n</i> -hexano + GPC.	GC-TSD GC-MS/MS	2.0 0.5	97 (9) 101 (5)	182
Aceite de Oliva	Extracción con hexano y ACN + Florisil.	GC-MS/MS	No	95 (<10)	184

Arroz	Extracción con ACN y clean up con <i>SPE</i> (Florisil).	HPLC-ESI hybrid linear IonTrap Orbitrap MS	6	89-99 (<10)	291
Leche	Extracción por diálisis difásica con diclorometano y sin purificación.	GC-NPD	10	88.7 (<1)	292
Paprika	<i>QuEChERS</i> con separación en hielo seco.	LC-MS/MS	20	111-120	293
Frutas y Verduras	<i>QuEChERS</i> tampón acetato y sin tamponar	LP-GC-TOF-MS (low pressure)	<25	96 (9)	257
Aceite de Palma	Extracción L-L con precipitación a baja T ^a y <i>MSPD</i> .	LC-TOF-MS	1.5	76-96 (<12)	273
Bebidas a base de frutas	HS-SPME (Headspace Solid-Phase MicroExtraction).	GC-MS	0.015	113 (<12)	286

CAPITULO II
**HIPÓTESIS, OBJETIVOS,
METODOLOGÍA Y PLAN DE
TRABAJO.**

II.1. Hipótesis de Trabajo .

El mal empleo de los pesticidas puede dar lugar a un problema de Seguridad tanto Ambiental como Alimentaria por lo que se hace necesario un rápido reconocimiento del alcance de la contaminación en las aceitunas con el fin de evitar la transferencia de los pesticidas al producto final o aceite de oliva.

El análisis de alimentos para la determinación de contaminantes orgánicos generalmente es un procedimiento complicado en el que están involucradas muchas etapas.

La exactitud y la precisión de los datos generados no dependen solamente de los sistemas cromatográficos usados sino que además, están basadas en la concatenación de una serie de etapas previas que incluyen la estrategia de muestreo, almacenamiento y pretratamiento de la muestra, técnicas de extracción utilizadas, y a veces la limpieza (*clean up*) de los extractos y/o preconcentración de la muestra.

Con esta premisa fue elaborada nuestra hipótesis de partida fundamentada en que la posible contaminación de las aceitunas es principalmente de tipo superficial debido a un mal uso de los pesticidas o al contacto del fruto con el suelo que previamente haya sido tratado con los mismos. En base a esta hipótesis, se plantea el objetivo de desarrollar un método rápido de cribado o *screening* para determinar la presencia de restos de pesticidas en aceitunas.

II.2. Objetivos.

La investigación que se recoge en la presente Tesis Doctoral ha tenido como objetivo el desarrollo y validación de un nuevo método analítico basado en la extracción y determinación de pesticidas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para el análisis cualitativo y cuantitativo de los pesticidas presentes en muestras de aceitunas.

Dicho método se ha desarrollado a partir de un *lavado superficial* de las aceitunas empleando diferentes tipos de disolventes orgánicos. Gradualmente todas las variables que podrían influir en el proceso de extracción y determinación fueron optimizadas, entre las que se pueden citar: el estudio del tipo y volumen de disolvente orgánico a utilizar, la cantidad de disolvente necesario para extraer la mayor cantidad de pesticidas en función de la cantidad de muestra utilizada, optimización de los tiempos y velocidades de agitación que se precisan para la eficiente extracción de los pesticidas de la superficie, efecto de la purificación de los extractos antes y después de la fortificación de las aceitunas, etc.

Así pues, los objetivos más relevantes a desarrollar del presente trabajo son los siguientes:

- ❖ Como **objetivo principal** el desarrollo una nueva metodología analítica rápida y sencilla para la determinación multiresiduo de los pesticidas presentes en la superficie del fruto de la aceituna en su recepción en

la Almazara, basado en un Análisis Superficial por Extracción Líquida o ASEL.

Otros **objetivos específicos** del trabajo fueron:

- ❖ Comprobar la validez de otros procedimientos de determinación para el conjunto de pesticidas objeto de estudio, que son utilizados habitualmente en los laboratorios de análisis de residuos como son el método *QuEChERS* y el método utilizado por *el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba* que emplea una adaptación del método desarrollado por *Aramendía et al* ¹⁸⁴.
- ❖ La validez del nuevo procedimiento de extracción (ASEL) será comparada con las otras dos metodologías estudiadas a partir del análisis completo del fruto, es decir, con previa molienda del mismo.
- ❖ Evaluación del *efecto matriz* en la determinación de los pesticidas en los extractos y para ello, serán analizados diferentes tipos de procedimientos de purificación o *clean up*, en los distintos procedimientos de extracción evaluados. Además, el análisis de la composición de los extractos que causa dicho efecto matriz, también será valorado. Asimismo, han sido especificadas alternativas para su disminución, evitando en lo posible un elevado coste de tiempo o tratamiento de muestra.

- ❖ La influencia del estado o nivel de maduración de las aceitunas sobre la determinación de los pesticidas será evaluada en dos de los procedimientos de extracción: *QuEChERS* y *ASEL*.
- ❖ Además, se estudiará el efecto del lavado de las aceitunas en la disminución de la carga de pesticidas objeto de estudio.
- ❖ La validación del nuevo procedimiento será evaluada a partir del estudio comparativo de los rendimientos obtenidos en muestras fortificadas por dicho procedimiento con los otros métodos de extracción, a partir de dos métodos de determinación cromatográficos: *GC-MS* y *UPLC-MS/MS*. La validación de toda la metodología analítica desarrollada en la presente Tesis Doctoral se fundamentará en la evaluación de los parámetros analíticos en base a las recomendaciones publicadas por la *UE* establecidos por las guías oficiales a través de la guía *SANCO /12571/2013* ²⁹⁴.
- ❖ Finalmente, la metodología desarrollada será validada tras el análisis de muestras reales obtenidas en almazaras de la provincia de Jaén.

II.3. Metodología y Plan de Trabajo.

La Metodología y el Plan de Trabajo seguidos en la presente Tesis Doctoral se detallan a continuación:

1. Selección de los pesticidas objeto de estudio. La selección de pesticidas objeto de este estudio ha sido realizada examinando las materias activas más frecuentemente empleadas como herbicida en el cultivo

del olivo y los insecticidas que eventualmente se detectan en este tipo de muestras, según la información recibida del *Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal* de Jaén y recogida en las *Memorias del Programa Nacional de Vigilancia de Residuos de productos Fitosanitarios en Origen* (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). Dicha selección estuvo formada por cinco herbicidas: *Amitrol, Diflufenican, Diuron, Terbutilazina* y *Oxyfluorfen*, y tres insecticidas, *Dimetoato, Fosmet* y *Clorpirifós*.

2. Revisión bibliográfica de las metodologías existentes para la determinación de los compuestos a estudiar, prestando especial atención a aquéllas basadas en LC-MS/MS.
3. Optimización de las condiciones de MS perfundiendo patrones de referencia de los pesticidas con el fin de establecer el ion precursor de cada compuesto y sus correspondientes iones producto para así poder determinar las transiciones más convenientes.
4. Optimización de la separación cromatográfica (UPLC) mediante inyección de patrones. Elección de la fase móvil y del gradiente cromatográfico que proporcionen adecuada retención, resolución y forma de pico.
5. Estudio de las *condiciones óptimas* para la extracción de los analitos de las muestras de aceituna mediante *Análisis Superficial por Extracción Líquida* o ASEL.

6. Estudio del posible *efecto matriz* mediante el análisis de patrones en disolvente y extractos de muestras fortificadas al mismo nivel de concentración. Estudio de la composición del extracto.
7. Estudio de la necesidad de una etapa de *purificación en los extractos* del nuevo método propuesto para paliar los efectos producidos por el *efecto matriz*.
8. Estudio del *efecto del lavado previo del fruto* en la extracción y determinación de los pesticidas.
9. Estudio del *efecto del estado de maduración* de las aceitunas en la extracción y determinación de los pesticidas
10. Validación de la metodología desarrollada estudiando los parámetros indicados en las guías europeas SANCO: linealidad, especificidad, exactitud y precisión.
11. Aplicación de la metodología LC-MS/MS desarrollada al análisis de muestras reales.
12. Comparación de la metodología propuesta con otras técnicas de extracción y determinación de pesticidas usadas en la actualidad de forma rutinaria.
13. Establecimiento de las principales conclusiones derivadas de las investigaciones realizadas en esta tesis.

CAPITULO III
**INSTRUMENTOS, APARATOS,
MATERIALES Y REACTIVOS.**

III.1. Reactivos y Materiales.

III.1.1. Muestras de Aceitunas.

Los estudios llevados a cabo en la Presente Tesis Doctoral fueron realizados a partir de muestras de aceitunas recogidas a lo largo de varias campañas, cuya procedencia varió en función del tipo de ensayo al que iban a ser sometidas.

Así, los ensayos de optimización y validación del método propuesto fueron realizados a partir de muestras de aceitunas obtenidas en la *Estación de Olivicultura y Elaiotecnia IFAPA-Centro Venta del Llano* (Mengíbar, Jaén, España) a partir de aceitunas libres de pesticidas que fueron recogidas directamente del árbol.

Por su parte, las aceitunas utilizadas para los ensayos de validez del método a partir de muestras reales fueron suministradas por el *Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal* de Jaén, procedentes de sus actividades habituales de control de residuos.

III.1.2. Disolvente y Reactivos.

⇒ Los disolventes utilizados durante la presente Tesis Doctoral tales como Acetonitrilo (99.8%), Metanol (99.8%), y ácido fórmico (pureza ~98%) fueron empleados en grado LC-MS. El Acetato de Etilo (99.8%) fue de grado HPLC mientras que Ciclohexano (99.5%) lo fue en grado GC. Todos ellos fueron adquiridos a *Sigma-Aldrich* (Madrid, España).

Por su parte, los disolventes *n*-Hexano y la Acetona fueron adquiridos a *Panreac* (Barcelona, España) en grado HPLC.

- ⇒ El agua “ultrapura” fue producida a través de un sistema de purificación *Milli-Q Reference*[®] (Millipore, Bedford, MA, USA). El Purificador Milli-Q dispensa el agua a través de un filtro de membrana de 0,22 μm y es capaz de suministrar agua con una calidad y pureza suficientes para la detección mediante Espectrometría de Masas sin necesidad de una filtración posterior.
- ⇒ Los reactivos y materiales utilizados se detallan en la Tabla III.1.1. que se muestra a continuación:

Tabla III.1.1. Materiales y Reactivos empleados en las etapas de purificación.

Material/Reactivos	Fabricante	Características
Florisil	VARIAN	MegaBe-FI 2g/12mL. Bondesil-FI-200μm.
NaCl	Panreac Chimica SA	99.5% pureza.
MgSO₄ anh.	Panreac Chimica SA	AppliChem (98% pureza).
PSA	SUPELCO	SupelClean™ PSA Bonded Silica.
C-18	J.T.Baker	Bakerbond Octadecyl C ₁₈ _40μm.
GCB	SUPELCO	SupelClean™ ENVI-Carb 120/400.

III.1.3. Sustancias Patrón.

Todos los patrones de pesticidas utilizados durante la presente Tesis Doctoral fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich* (Madrid, España) con una pureza > 99%.

Las disoluciones “stock” de cada uno de los patrones individuales fueron preparadas pesando exactamente la cantidad de 25 mg de cada uno de los compuestos y diluida con 50 mL de ACN. Posteriormente, estas disoluciones fueron almacenadas en condiciones de oscuridad en el congelador a -18°C.

Las disoluciones de trabajo multicomponente ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) fueron preparadas semanalmente con apropiadas diluciones a partir de las disoluciones “stock” de los patrones individuales con ACN y almacenadas a 4°C. Estas disoluciones fueron utilizadas para preparar las correspondientes curvas de calibración. Al finalizar cada semana de trabajo fueron desechadas y preparadas de nuevo.

Las disoluciones de fortificación multicomponente de las aceitunas fueron preparadas mezclando cantidades apropiadas de las disoluciones “stock” con una mezcla ACN:Acetona (45:55) para obtener tres niveles de concentración de 2, 10 y $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

III.1.4. Gases Empleados.

El gas nitrógeno utilizado para la desolvatación de los iones por espectrometría de masas fue obtenido a través de un generador *Nitrogen Zefiro 35 LC-MS* que fue mantenido durante los análisis entre 6.9-7.2 bar.

El gas argón (UN 1006) utilizado para la rotura de las moléculas por LC-MS y el gas Helio (UN 1046) usado como gas portador en el sistema de GC-

MS, fueron adquiridos a través de la empresa de “*Productos y Suministros AbelloLinde, Gases Industriales España*”.

III.2. Instrumentos y Aparatos.

III.2.1. Equipo de Extracción *Vibromatic*®.

Para extraer los pesticidas de las muestras de aceituna se utilizó un agitador-vibrador automático de movimiento oscilante *Vibromatic*, Selecta (Barcelona, España). Este aparato presenta una velocidad de oscilación variable entre 100 y 990 oscilaciones por minuto (opm).

III.2.2. “Kit” de Filtración a Vacío.

Las muestras reales una vez sometidas al proceso de análisis superficial por extracción líquida (ASEL) fueron filtradas a través de un sistema de filtración a vacío empleando filtros de 47mm de diámetro (*Whatman GF/A/180-047*) a fin de eliminar los restos de sólidos procedentes de la superficie de las aceitunas.

III.2.3. Equipo de molturación de aceituna.

Para la molienda del fruto se empleó un molino de martillos de laboratorio con criba de 5 mm modelo MM-100 (MC2 Ingeniería y Sistemas SL, Sevilla, España).

III.2.4. Aparatos de homogenización.

- Para la extracción y homogenización de las muestras de aceitunas reales previamente molturadas con el ACN se utilizó un agitador-homogeneizador dispersador *UltraTurrax*® T-50 (Ika, Staufen, Alemania).
- Un mezclador *Vórtex* de alta velocidad Heidolph Reax Top (Nuremberg, Alemania) se utilizó para mezclar-homogenizar los viales antes del análisis cromatográfico.

III.2.5. Equipo de centrifugación.

Una centrifuga *Selecta Medifriger BL-S* (Barcelona, España) con temperatura regulable de 0-30 °C fue utilizada tanto en la etapa de extracción como en la de purificación de los extractos en el método QuEChERS. La velocidad empleada fue de 4600rpm durante no menos de 2 min.

III.3. Sistema Cromatográfico UPLC-MS.

⇒ Cromatografía de líquidos.

La separación cromatográfica de los pesticidas se realizó en un sistema *Waters ACQUITY UPLC* (Waters, Manchester, Reino Unido) compuesto de tres módulos, *Binary Solvent Manager* (compuesto de cuatro bombas que permite las mezclas binarias de los disolventes), *Sample Manager* (un compartimento de alojamiento y acondicionamiento de la muestra) y

Acquity UPLC Column heater (compartimento donde se aloja la columna dotado con un sistema de calentamiento de la misma).

⇒ Espectrometría de masas.

La detección se realizó usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo en tándem *Acquity TQD* (Waters, Manchester, Reino Unido), equipado con interfaz de ionización por electrospray (ESI) y operando en modo de iones positivos. La fuente de iones se mantuvo a 150 °C con un voltaje capilar de 1,0 kV. El nitrógeno fue empleado tanto para la desolvatación de los iones como para el gas de cono a 650 °C y 50 L·h⁻¹, respectivamente. El modo de adquisición de datos fue de monitorización de reacción múltiple (MRM) empleando como gas de colisión el argón a una presión de 3,5 x 10⁻³ mbar.

Las condiciones de MRM se optimizaron para cada pesticida perfundiendo cada uno de los patrones individuales de pesticidas a una concentración comprendida entre 2-10 mg·L⁻¹. Finalmente, la adquisición y el procesamiento de datos se realizaron con el programa *MassLynx 4.1* y *Quanlynx* (Waters, Manchester, Reino Unido).



Figura III.1. Sistema cromatográfico UPLC-MS/MS (*Waters Acquity*, Reino Unido).

III.4. Sistema Cromatográfico GC-MS.

El equipo utilizado para la determinación de los pesticidas a través de GC-MS fue un VARIAN SATURNO 2000, el cual estaba equipado con un inyector PTV para columnas capilares y acoplado a un espectrómetro de masas con Trampa de Iones. Dicho cromatógrafo trabajaba con columna capilar TRB-5MS de 30 m, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor (Teknokroma, Barcelona, España) empleando He como gas portador.



Figura III.2. Sistema cromatográfico de GC-MS (Varian 2000).

CAPITULO IV

DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS MEDIANTE UPLC-MS/MS: Optimización de las condiciones para la separación y determinación cromatográfica de los pesticidas, identificación y cuantificación.

IV.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA SEPARACIÓN DE LOS ANALITOS.

La separación cromatográfica se realizó usando una columna de separación de analitos *Waters Acquity UPLC BEH C18* (2,1 mm x 100 mm) formada por partículas de 1,7 μm (Milford, MA, EE.UU.), la cual puede soportar presiones de hasta 15000 psi. Esta columna además, cuenta con dos pares de filtros y un prefiltro, para evitar la colmatación de la misma por la inyección repetida de muestras. Durante la separación cromatográfica la columna fue mantenida a 40 °C, con una velocidad de flujo de la fase móvil de 0,25 mL·min⁻¹. Ambas condiciones fueron optimizadas previamente siendo éstas las que mejor separación ofrecían.

La fase móvil utilizada para la correcta separación estaba formada por agua (A) y metanol (B), ambos con 0,1% de ácido fórmico. El gradiente de elución empleado comenzó con un 10% de B que fue linealmente aumentado hasta alcanzar un 90% en 2 min. La composición de la mezcla se mantuvo con 90% de B durante 2 min antes de volver a las condiciones iniciales de 10% de B, seguido por re-equilibrado durante 1 min, generando un ciclo total de 5 min. El volumen de inyección para cada muestra fue de 10 μL en modo "*full loop*" y la temperatura de la muestra se mantuvo a 10°C.

Dos mezclas disolventes de lavado fueron empleadas entre muestras para el lavado de la aguja y del circuito entre muestras. Los lavados consistieron primero en un primer lavado introduciendo una mezcla de

agua/ACN (50:50) seguido de un *lavado suave* con una mezcla agua: MetOH con proporciones 90:10 (para que la composición fuera idéntica a la de la fase móvil inicial) empleando en cada uno de ellos 300 y 600 μL , respectivamente. La composición de la fase móvil empleada durante la separación cromatográfica puede verse resumida en la **Tabla IV.1.1.**

Tabla IV.1.1. Condiciones finales de la fase móvil.

TIEMPO (min)	FLUJO (mL/min)	%A	%B
0,00	0,25	90	10
1,00	0,25	90	10
3,00	0,25	10	90
4,00	0,25	10	90
4,01	0,25	90	10
5,00	0,25	90	10

IV.2. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES PARA LA DETECCIÓN DE LOS ANALITOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Con el fin de establecer las mejores condiciones de identificación de los pesticidas se realizaron una serie de experimentos preliminares para obtener una buena identificación de todos ellos a nivel de trazas.

La detección de los pesticidas fue realizada empleando el citado espectrómetro de masas *Acquity TQD-MS* (Waters, Manchester, Reino Unido), equipado con una interfase de ionización por electrospray (Z-spray) y de funcionamiento en modo de iones positivos (ESI+). La fuente de iones se mantuvo a 150°C con un voltaje capilar de 1,0 kV. El gas nitrógeno fue

empleado para la desolvatación de los iones, empleando un caudal de 50 L·h⁻¹ y una temperatura de 650 °C.

El gas argón fue empleado para la rotura de las moléculas a una presión de 3,5 x 10⁻³ mbar y el modo de adquisición empleado fue de monitorización de reacción múltiple (MRM). Las condiciones de MRM fueron optimizadas para cada pesticida a través de la perfusión de las disoluciones patrón de cada uno de los pesticidas en ACN por separado.

La optimización de las condiciones del MS para la determinación de los pesticidas seleccionados se llevó a cabo mediante el estudio de los espectros en “*full scan*” y *MS/MS* obtenidos para cada compuesto. En primer lugar, se realizaron ensayos perfundiendo directamente entre 7-10 µL de las disoluciones patrón de cada uno de los pesticidas en ACN a una concentración de 4 µg·mL⁻¹ en el MS sin aplicar ninguna energía de colisión, con el fin de optimizar el voltaje de cono necesario para maximizar la señal de cada analito. Para ello, diferentes voltajes de cono fueron estudiados en el rango entre 5,0-60,0 V.

Tras la optimización del voltaje de cono, se llenó la célula de colisión con argón, y se procedió a optimizar la energía de colisión de forma que se obtuviera la máxima señal correspondiente a los fragmentos generados.

Finalmente, la optimización del “*Dwell Time*” fue llevada a cabo para cada uno de los pesticidas en estudio en el rango de 5 hasta 200 ms.

Con el propósito de aumentar la selectividad de los métodos desarrollados se utilizaron dos transiciones por cada analito. La transición más sensible fue utilizada como transición de cuantificación, mientras que la menos sensible se utilizó con fines confirmatorios.

De esta manera, una muestra sólo fue considerada positiva si los cromatogramas para las dos transiciones de un mismo compuesto presentaban un pico correspondiente al mismo tiempo de retención para una concentración dada y evidenciando además que la relación entre los iones (*Ion Ratio*) fuera constante tanto para los patrones como más adelante, para las muestras. Este hecho minimizó la aparición de falsos positivos aumentando la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Para la determinación en muestras reales fue aplicado un MRM (*multiple reaction monitoring*), ya que es el modo más sensible de detección con triples cuadrupolos y en los que cada compuesto tendrá una transición a seguir, entendiendo como transición la combinación de ión padre (ión precursor o de cuantificación, Q) e ión hijo (ión de confirmación, q). Las condiciones seguidas por el MS en este estudio quedan reflejadas en la **Tabla IV.2.1.**

Tabla IV.2.1. Condiciones establecidas en el MS para cada una de las dos transiciones necesarias para la identificación inequívoca de cada pesticida.

PLAGUICIDAS	Masa Molar	Voltaje de Cono (V)	1ª Transición (Cuantificación)			2ª Transición (Confirmación)			Ion Ratio (Q/q)	Dwell Time (ms)	t _R (min)	Ionización
			Ion Precursor (m/z)	Ion Producto (m/z)	Energía de Colisión (eV)	Ion Precursor (m/z)	Ion Producto (m/z)	Energía de Colisión (eV)				
DIFLUFENICAN	394,07	48	395,22	266,20	44,00	395,22	246,20	44,00	1,29	20	3,65	ESI +
CLORPIRIFOS	348,93	33	350,03	198,25	23,00	350,03	107,00	56,00	0,62	20	3,94	ESI +
FOSMET	317,00	25	318,04	160,10	16,00	318,04	133,20	52,00	25,00	20	3,36	ESI +
DIURON	232,02	40	233,05	72,20	31,00	233,05	160,00	33,00	28,00	15	3,36	ESI +
TERBUTILAZINA	229,11	35	230,22	174,10	20,00	230,22	96,20	33,00	6,01	20	3,43	ESI +
DIMETOATO	229,00	25	230,00	199,00	25,00	230,00	125,10	24,00	1,41	50	3,01	ESI +
AMITROL	84,04	45	85,06	43,30	16,00	85,06	57,30	14,00	0,51	50	0,99	ESI +
OXIFLUORFEN	361,70	33	362,00	316,00	10,00	362,00	237,50	20,00	15,85	20	3,78	ESI +

IV.3. OPTIMIZACIÓN DEL DWELL TIME.

El “*dwell time*” para cada uno de los pesticidas en estudio fue optimizado de forma independiente. Este parámetro representa el tiempo que el analizador va a estar adquiriendo un determinado ion, lo que influye en la sensibilidad de la determinación y depende del número de iones que el equipo monitorice de manera simultánea.

La influencia del *dwell time* en la señal de pico de cada compuesto fue evaluada entre 5 s y 200 ms, encontrándose que para cada pesticida existía un valor de éste que maximizaba la sensibilidad y mejoraba la forma de pico en cada uno de los compuestos.

Para realizar este estudio se emplearon disoluciones patrón de pesticidas en ACN a tres concentraciones diferentes de 10, 50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ que fueron inyectados en el sistema LC-MS manteniendo constantes las condiciones cromatográficas óptimas establecidas pero variando el valor del *Dwell Time*. Finalmente, para cada uno de los pesticidas en estudio fue seleccionado un valor que maximizara la sensibilidad y mejorase la forma del pico. Así, se estimó como valor óptimo de *Dwell Time* 50 ms para Dimetoato y Amitrol, 15 ms para Diuron y 20 ms para el resto de pesticidas. Los resultados pueden verse gráficamente en la **Figura IV.1.1**.

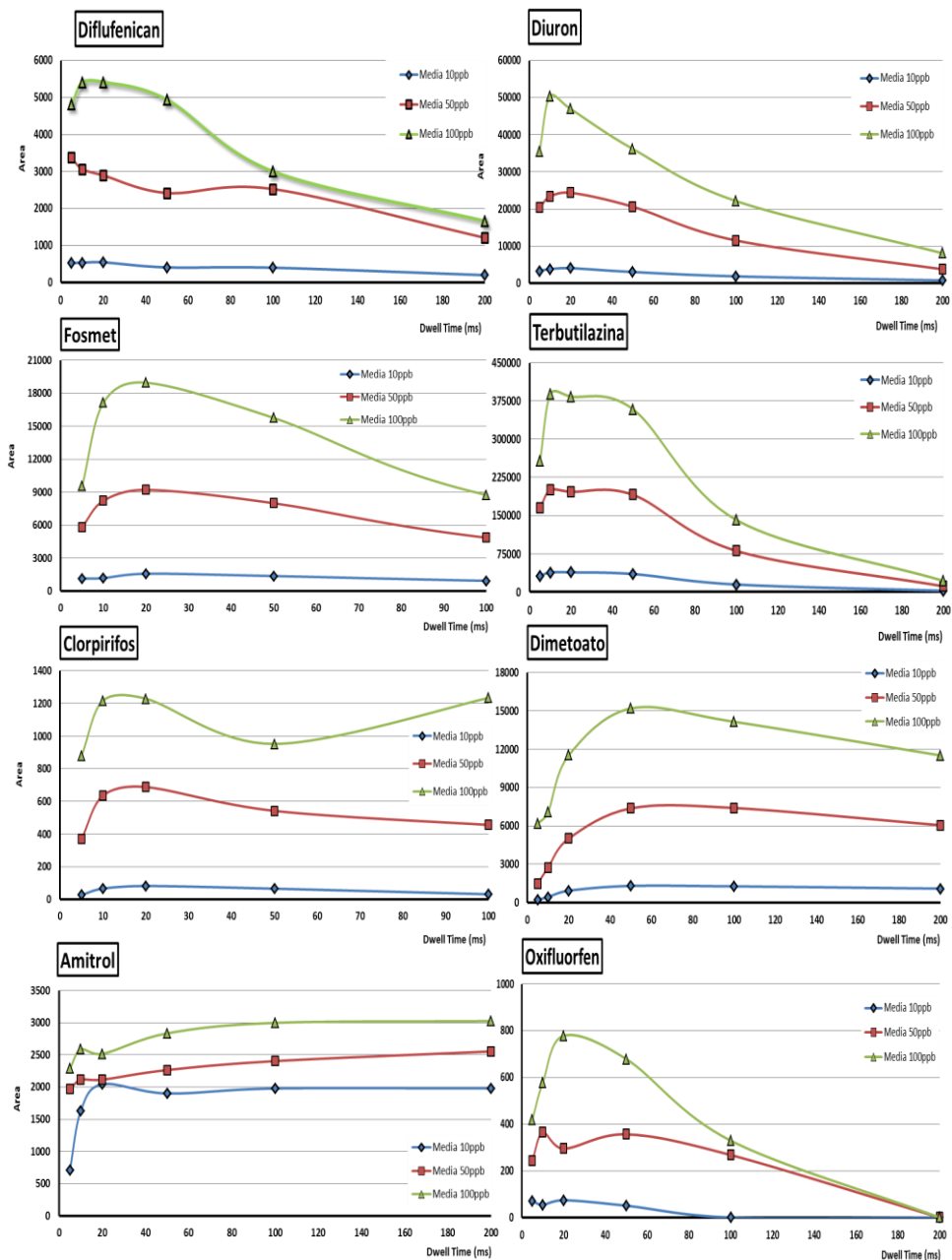


Figura IV.1.1. Optimización del *Dwell Time* a partir de tres concentraciones diferentes de pesticidas en ACN. Los resultados corresponden a la media de 5 repeticiones por concentración y tiempo.

CAPITULO V

Determinación de pesticidas en aceitunas mediante análisis superficial por extracción líquida (ASEL).

V. DETERMINACION DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS MEDIANTE ASEL.

Todos los pesticidas cuantificados en los ensayos realizados en el presente capítulo fueron interpolados en sus respectivas rectas de calibrado en matriz e inyectados en el UPLC-MS/MS con un volumen de inyección de 10 μL y bajo las condiciones especificadas en las **Tabla IV.1.** y **IV.2.**

V.1. MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN.

Dos métodos de fortificación de las aceitunas fueron desarrollados, el método en *monocapa* y en *multicapa*.

V.1.1. Método de fortificación *monocapa*.

V.1.1.1. Parte Experimental.

Para la realización de este tipo de fortificación fueron seleccionadas aceitunas recogidas directamente del árbol y posteriormente, fueron divididas en tres grupos de fortificación hasta alcanzar tres concentraciones finales de 500, 200 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

El procedimiento para la fortificación de las aceitunas consistió en pulverizar sobre una “*monocapa*” de aceitunas la mezcla de los plaguicidas correspondiente al nivel de concentración deseado. Así, sobre una monocapa de 1 kg de aceitunas fueron dispuestas superficialmente sobre una lámina donde se asperjaron 50 mL de una disolución de pesticidas disueltos en ACN a 2, 4 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para obtener tres muestras finales de

1kg de aceitunas a concentración de 100, 200 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente.

Una vez fortificadas las aceitunas se expusieron al aire durante un total de 12h para evaporar los posibles restos de disolvente y posteriormente, fueron congeladas a -18°C hasta su análisis.

V.1.1.2. Resultados y Discusión.

A fin de comprobar si tras la aplicación del método en *monocapa* la fortificación de las aceitunas había sido la deseada, se tomaron muestras de los tres niveles de concentración aplicados y se evaluó su contenido en la *Unidad de Espectrometría de Masas de Servicio Central de Apoyo a la Investigación* (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Los resultados encontrados mostraron que los niveles alcanzados por este tipo de fortificación no eran satisfactorios y los resultados fueron del orden del 50% menos de la cantidad introducida. Además, los resultados no fueron reproducibles, de modo que para los análisis de validación se realizó otro tipo de fortificación, en este caso en *multicapa*.

V.1.2. Método de fortificación *multicapa*.

V.1.2.1. Parte Experimental.

Para realizar la fortificación *multicapa*, fueron incluidas en un recipiente de pequeño tamaño (25 cm de diámetro) 0,5 kg de aceitunas, con el fin de que las aceitunas fueran divididas en al menos dos o tres capas.

A continuación, 0,5 mL de solución de fortificación con la mezcla de pesticidas fue pulverizada sobre la primera capa hasta que prácticamente fue evaporado el disolvente.

Las aceitunas se mezclaron con el fin de alcanzar una distribución aleatoria y, a continuación, fueron pulverizadas de nuevo. Este proceso se repitió hasta que todas las aceitunas estuvieran perfectamente rociadas con la disolución de pesticidas usando un volumen total final de 5,0 mL por lo que, aproximadamente por nivel de concentración tuvieron lugar 10 pulverizaciones por recipiente.

Este proceso de fortificación se llevó a cabo a los niveles de concentración 20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, y para ello se partió de tres disoluciones patrón de mezcla de pesticidas a 2, 10 y 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Inicialmente, la acetona fue usada como disolvente debido a su alta volatilidad. Sin embargo, en la práctica se observó que dicha volatilidad era excesiva, dificultando el mojado de la superficie a fortificar. Por esta razón, la solución de adición se preparó mezclando ACN: acetona (45:55, v/v) para garantizar una correcta adherencia al mismo tiempo que se consigue una rápida evaporación del disolvente.

Una vez fortificadas las aceitunas se expusieron al aire durante un total de 12h para evaporar los posibles restos de disolvente y posteriormente, fueron congeladas a -18°C hasta su análisis.

V.1.2.2. Resultados.

Para comprobar la validez del método de fortificación se tomaron muestras de los tres niveles de concentración aplicados y se evaluó nuevamente su contenido en pesticidas en el SCAI de la Universidad de Córdoba. Los resultados obtenidos mostraron que el procedimiento en multicapa ofrecía resultados de recuperación satisfactorios, encontrándose valores de RSDs < 20% en todos los pesticidas estudiados. Los valores de recuperación obtenidos para cada pesticida pueden verse en la **Tabla V.1.**

Tabla V.1. Recuperaciones medias ($n=5$) obtenidas a través del análisis de muestras de aceitunas fortificadas en multicapa a tres niveles de concentración de 20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ por GC-MS.

($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	DIURON	DIFLUFENICAN	OXYFLUORFEN	DIMETOATO	FOSMET	TBA
20	80 (12)	100 (15)	100 (17)	110 (14)	102 (18)	80 (10)
100	90 (10)	85 (10)	105 (14)	105 (12)	105 (15)	80 (9)
250	95 (9)	83 (14)	95 (10)	85 (18)	118 (12)	80 (5)

A la vista de los resultados encontrados se aceptó como válido este método de fortificación superficial de las aceitunas. Los pesticidas Amitrol y Clorpirifos no se incluyeron en este análisis, puesto que fueron introducidos en etapas posteriores del procedimiento.

Una vez comprobada la validez del método en multicapa se adoptó este sistema de fortificación para realizar el resto de ensayos y estudios llevados a cabo en la presente Memoria.

V.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN.

Los ensayos de optimización fueron realizados de forma *univariante*, es decir, para cada variable en estudio se ensayaron diferentes valores pero manteniendo constantes el resto de variables de optimización.

Todas las variables fueron estudiadas a partir de muestras de aceitunas que fueron previamente fortificadas en multicapa a nivel de $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

V.2.1. Selección del disolvente de extracción.

La primera de las variables a optimizar fue el disolvente orgánico de extracción, es decir, la elección del disolvente que pudiera extraer la mayor cantidad de los pesticidas presentes en la superficie de las aceitunas. Dado que uno de los objetivos del nuevo método de extracción es la disminución en el número de etapas analíticas, a fin de evitar el uso de disolventes muy apolares que debieran evaporarse antes de incorporarse al equipo de UPLC-MS/MS, se seleccionaron como disolventes de extracción disolventes orgánicos de polaridad intermedia. Así, fueron objeto de estudio 4 disolventes o mezclas de disolventes de extracción: MetOH, ACN, mezcla ACN:MetOH (20:80) y mezcla Agua:MetOH (1:3).

El *acetonitrilo* (ACN) fue seleccionado por ser el disolvente de extracción más comúnmente utilizado en la extracción de residuos de pesticidas en todo tipo de matrices y en diferentes métodos como el método *QuEChERS*¹⁹⁶.

El *metanol* (MetOH) fue elegido por ser el disolvente de la fase móvil con el fin de mejorar la calidad de la determinación cromatográfica, y además, porque al ser de polaridad similar al ACN podría tener características similares de extracción.

Las mezclas agua:metanol y ACN:MetOH fueron seleccionadas con el fin de variar la polaridad del extractante, sin llegar a límites en los que también se extrajesen grasas o ceras, dado que existen diferencias de polaridades entre los pesticidas seleccionados y por lo tanto, se pretendía escoger el extractante que mayores rendimientos generase.

V.2.1.1. Parte Experimental.

Las pruebas iniciales fueron realizadas empleando 30 g de aceitunas previamente dopadas en multicapa que fueron tratadas con 30 mL de cada uno de los extractantes en estudio, es decir, se mantuvo inicialmente una relación 1:1 (*p/v*).

La extracción se realizó con una agitación manual durante de 5 min. Además, cabe mencionar que los extractos no sufrieron etapas posteriores de purificación.

Para la determinación de la cantidad de matriz extraída se tomó una alícuota del extracto y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a vacío. Por diferencia de peso se calculo la cantidad absoluta de extracto contenida en la citada alícuota.

V.2.1.2. Resultados.

Como primer aspecto a considerar, con el fin de seleccionar el mejor disolvente que proporcionase al mismo tiempo una buena extracción y unos extractos más limpios a fin de reducir o eliminar etapas posteriores de purificación, se estudió la cantidad de matriz extraída por cada uno de los extractantes. La cantidad absoluta de extracto obtenido por cada disolvente fue medida en peso, encontrándose valores muy diferentes para los cuatro extractantes. Los resultados se muestran en la **Tabla V.2.1**.

Tabla V.2.1. Cantidad de matriz absoluta extraída empleando diferentes disolventes de extracción, expresada en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de aceituna procesada.

EXTRACTANTE	CANTIDAD DE MATRIZ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	MEDIA ($n=6$)	$\pm SD$	RSDs
100% Acetonitrilo (ACN)	2,47	0,19	8%
100% Metanol (MetOH)	13,20	3,96	30%
20% MetOH + 80% ACN	4,55	1,63	36%
Agua:MetOH (1:3)	4,59	0,53	12%

Los resultados mostraron que el MetOH extraía mayor cantidad de matriz (13,20 mg) en comparación con los aproximadamente 4,6 mg que extrajeron las mezclas de disolventes por cada 1 g de aceitunas o los 2,5 mg obtenidos por el ACN.

El segundo aspecto a considerar fue el porcentaje de recuperación obtenido con cada extractante. Como se ha indicado anteriormente, las muestras empleadas en este ensayo estaban fortificadas a un nivel de 100

$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Los resultados medios de cuatro de los pesticidas en estudio correspondientes se muestran en la **Tabla V.2.2**.

Las recuperaciones medias obtenidas mostraron que el mejor extractante variaba en función de la naturaleza química del pesticida. No obstante, la mayoría de los pesticidas fueron mejor extraídos con el ACN. Sin embargo, bajo idénticas condiciones los extractantes con MetOH dieron en algunos casos valores de recuperación muy por encima del valor de fortificación. Además, la dispersión de resultados que mostraron los extractos obtenidos con MetOH fue superior al 20%. Finalmente, en el caso de la mezcla *agua:MetOH* (1:3) las recuperaciones no alcanzaron más del 30%.

Tabla V.2.2. Recuperaciones medias para muestras dopadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n=5$) usando diferentes disolventes de extracción empleando 5 min de agitación manual.

Pesticidas	100% ACN		100% MetOH		<i>Agua:MetOH</i> 1:3		<i>MetOH:ACN</i> 20:80	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Diflufenican	84	17	156	27	29	5	161	34
Fosmet	76	19	81	21	19	11	136	25
Diuron	62	14	58	24	25	3	67	27
TBA	71	9	147	19	27	8	129	22
Dimetoato	41	8	41	8	21	11	33	28
Amitrol *	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

*. *El Amitrol no fue detectado en el presente ensayo.*

En base a lo anteriormente expuesto se seleccionó el ACN como disolvente de extracción, ya que bajo las condiciones ensayadas extrajo de forma más eficiente la mayor parte de los pesticidas, con un extracto mucho más limpio que el resto de extractantes ensayados, por lo que α

priori sus resultados estarían menos afectados de posibles interferencias de la matriz, con el objeto de poder evitar posteriores etapas de purificación en el proceso analítico.

V.2.2. Optimización de la Relación Peso de muestra/ Volumen Extractante

V.2.2.1. Parte Experimental.

Una vez seleccionado como disolvente de extracción el ACN se evaluó la relación entre la cantidad de muestra y el volumen de extractante que maximizase las recuperaciones de los pesticidas en estudio. Para ello, se estudiaron tres posibles relaciones volumen de extractante/peso de aceituna utilizados. Las relaciones ensayadas fueron 1:1, 1:3 y 1:5, para las cuáles se mantuvo un peso constante de 30g de aceituna y se varió el volumen de ACN hasta alcanzar la relación adecuada. Las extracciones fueron realizadas durante 5 min con agitación manual.

V.2.2.2. Resultados.

Los resultados mostraron que en el caso de algunos analitos como el Diflufenican o Fosmet no existe una influencia significativa del volumen de extractante en las recuperaciones, mientras que en otros casos éstas disminuyen al aumentar aquél.

En el caso del Amitrol las recuperaciones medias fueron muy bajas en los tres tratamientos. No obstante, puede observarse que se extrae mayor cantidad a medida que se incorpora más disolvente. Este hecho puede sugerir que existe un acentuado efecto matriz en la determinación del Amitrol, por lo que cuanto más concentrado está el extracto, es decir con mayor cantidad de aceitunas con respecto al volumen de disolvente, mayor

es la concentración de matriz será extraída y por lo tanto, mayor será la interferencia sobre su determinación. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura V.2.1**.

A la vista de estos resultados, fue seleccionado como mejor tratamiento para seguir con la optimización del proceso la relación 1:1, ya que generaba las mejores recuperaciones y además, utiliza una menor cantidad de disolvente en relación a la cantidad de aceituna.

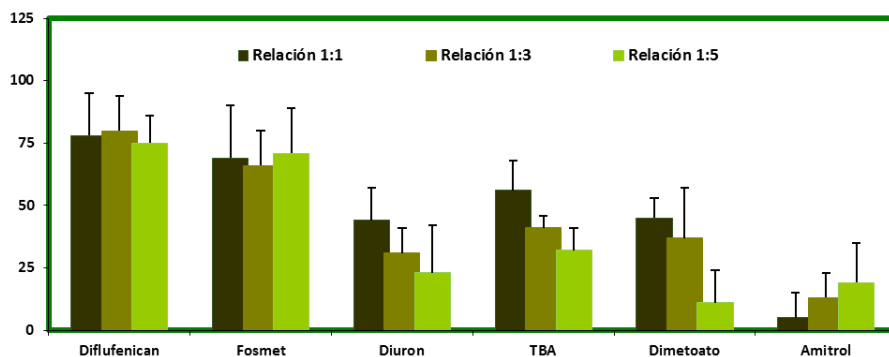


Figura V.2.1. Recuperaciones medias ($n=5$) a partir de muestras fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, empleando tres tipos distintos de relación volumen extractante/peso de muestra a partir de ensayos ASEL durante 5 min de agitación manual.

V.2.3. Tiempo y velocidad de agitación durante la extracción.

Indudablemente, tanto el tiempo de extracción como lo energética que fuera la agitación durante dicha extracción eran también variables a optimizar durante la puesta a punto del método. Para esta parte del estudio se empleó tanto una agitación manual, tratando de que dicha agitación fuera lo más reproducible posible, como una agitación mecánica, empleando el agitador Vibromatic anteriormente descrito.

V.2.3.1. Parte Experimental.

Para la realización de estos ensayos se emplearon lotes de 30 g de aceitunas dopadas a un nivel de $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ que se extrajeron con 30 mL de ACN en un recipiente con tapón roscado.

En el caso de *agitación manual* sólo se estudió el efecto del tiempo empleado de extracción. Para ello se llevaron a cabo diferentes extracciones de 1, 2, 5 y 10 min.

En el caso de *agitación mecánica* se estudió tanto el efecto de la velocidad de agitación como del tiempo de extracción. Para la comparación de las diferentes velocidades de agitación se empleó un tiempo de extracción de 5 min, seleccionando velocidades de agitación de 100, 250, 500, 750 y 990 oscilaciones por minuto (opm). Para el estudio del efecto del tiempo se seleccionó una velocidad de 750 opm, que se aplicó durante tiempos crecientes de extracción de 1, 2, 5, 10 y 15 min.

V.2.3.2. Resultados con agitación manual.

La extracción manual presenta, a priori, el problema de ser una tarea tediosa para el analista y poco reproducible. Además la productividad es muy limitada, pues solo se puede procesar una muestra. Los resultados encontrados se muestran en la **Tabla V.2.3**.

Tabla V.2.3. Recuperaciones obtenidas a partir de aceitunas dopadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n=5$) a diferentes tiempos de extracción manual.

	1min		2min		5min		10min	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Diflufenican	72	13	70	18	72	21	72	16
Fosmet	50	9	62	14	70	20	71	25
Diuron	37	14	44	17	43	11	47	18
TBA	50	12	55	12	64	15	64	17
Dimetoato	30	12	35	15	42	16	43	18
Amitrol	10	25	12	23	12	18	11	38

A la vista de los resultados obtenidos empleando *agitación manual* para la extracción de los analitos podemos concluir que a medida que se aumenta el tiempo de agitación, la cantidad de pesticidas extraída es mayor, llegando a un máximo que no ofrece diferencias significativas entre 5 y 10 min.

Las recuperaciones fueron en general bajas, observándose en el caso de Diuron y TBA un aumento de las recuperaciones al aumentar el tiempo de extracción. Sin embargo, esto no fue así para el Amitrol o el Diflufenican, dando lugar en los cuatro tratamientos a valores similares de recuperación. Este hecho podría explicarse porque la cinética de extracción fuera más

rápida que para el resto de plaguicidas estudiados, por lo que en poco tiempo de contacto con el disolvente se alcanzaría el equilibrio de extracción.

Finalmente, aunque se concluyó que el mejor tiempo de extracción para los pesticidas ensayados era de 5 min ya que no existían diferencias significativas con respecto a los 10 min de extracción manual, los resultados no fueron satisfactorios debido a los bajos porcentajes de recuperación obtenidos. Este hecho, sumado a otros inconvenientes de la agitación manual como la baja repetibilidad, laboriosidad, baja productividad, etc, llevó a considerar la posibilidad de aplicar una agitación mecánica, cuyas condiciones pudieran ser optimizadas a la vez que reproducibles.

V.2.3.3. Resultados con agitación mecánica.

Las recuperaciones encontradas en el caso de la aplicación del método con agitación mecánica fueron creciendo al aumentar la velocidad de oscilación hasta alcanzar un máximo a 750 opm, a partir del cual disminuyeron drásticamente, tal y como se puede apreciar en la **Figura V.2.2.**

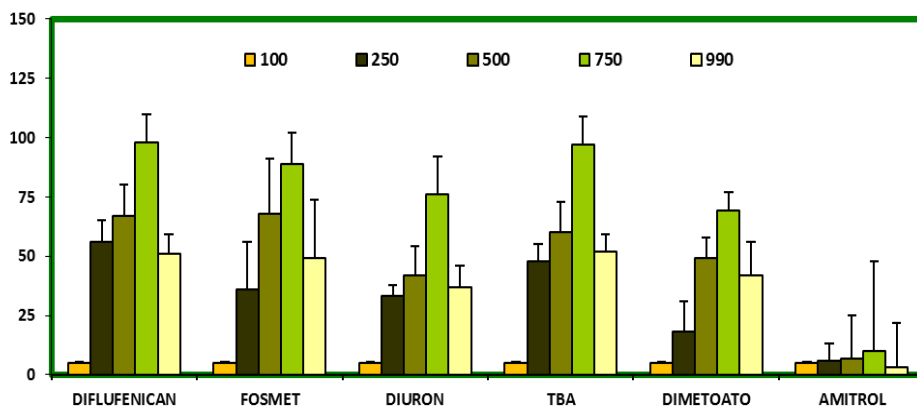


Figura V.2.2. Recuperaciones medias ($n=5$) en función de la velocidad de agitación a un mismo tiempo de extracción (5 min).

Una vez seleccionada como velocidad óptima 750 opm se procedió a evaluar diferentes tiempos de agitación. Para este propósito, se ensayaron 1, 2, 5, 10 y 15 min de agitación y se evaluaron los porcentajes de recuperación obtenidos por cada uno de ellos.

Así, se comprobó que al incrementar el tiempo se aumentaba la cantidad de analito recuperado, alcanzándose el máximo a los 10 min de agitación. Todos estos resultados se muestran de forma gráfica en la **Figura V.2.3.**

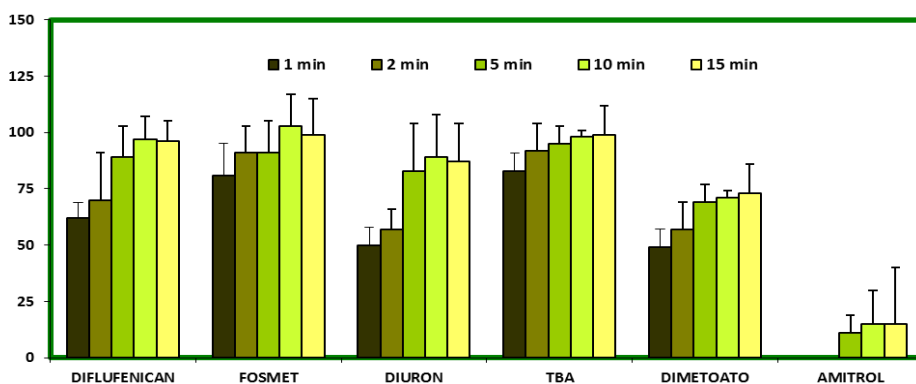


Figura V.2.3. Recuperaciones medias ($n=5$) en función del tiempo a una misma velocidad de agitación mecánica de 750 opm.

Finalmente, se concluyó que el método de agitación mecánica generaba mejores resultados que el manual, siendo la combinación de variables experimentales óptimas el ACN como disolvente de extracción, una velocidad de 750 opm durante 10 min de agitación y una relación volumen extractante/peso muestra de 1:1.

V.2.4. Evaluación del número de extracciones.

V.2.4.1. Parte Experimental.

Otra de las variables por optimizar del método ASEL fue el número de extracciones que son necesarias para extraer la mayor cantidad de pesticidas, ya que a la vista de los resultados encontrados para determinados pesticidas como el Diuron o el Dimetoato, no se alcanzaban más del 89% o 71% de recuperación, respectivamente, por lo que se hizo necesario evaluar la capacidad extractante del ACN en una o en dos extracciones.

Para el ensayo se seleccionaron 30 g de aceitunas previamente dopadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ fueron sometidas al tratamiento ASEL bajo las condiciones anteriormente optimizadas. A continuación, una vez separado el extracto, las aceitunas fueron de nuevo sometidas a una segunda extracción con las mismas condiciones ensayadas en el primer caso.

V.2.4.2. Resultados.

Los resultados encontrados tanto para la primera como para la segunda extracción se muestran en la **Tabla V.2.4.**

A la vista de los resultados, podemos observar que se obtuvieron porcentajes de recuperación satisfactorios para 6 de los 8 pesticidas con una única extracción, alcanzándose recuperaciones superiores al 70% dentro de la primera extracción.

Tabla V.2.4. Recuperaciones medias (RSDs) obtenidas a partir del ensayo de extracción ASEL sobre muestras fortificadas con una y dos extracciones ($n=5$).

PESTICIDA	1ª EXTRACCIÓN		2ª EXTRACCIÓN		TOTAL
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)
DIFLUFENICAN	94	18	3	14	97%
CLORPIRIFOS	79	16	3	10	82%
FOSMET	93	20	2	20	95%
DIURON	83	17	2	20	85%
TBA	96	13	3	15	99%
DIMETOATO	70	11	3	16	73%
AMITROL	8	5	2	40	10%

La realización de una segunda extracción en las aceitunas proporcionó sólo un 3% adicional a la primera recuperación. Sin embargo, ya que es un valor pequeño y constante, se consideró que una única extracción era suficiente para alcanzar buenas recuperaciones para el conjunto de los pesticidas, simplificándose así el procedimiento y minimizándose el tiempo y coste por análisis.

Cabe destacar los pobres resultados obtenidos para Amitrol con recuperaciones muy deficientes. Este hecho coincide con lo publicado hasta la fecha en la bibliografía, en la que no se encuentran antecedentes de la determinación de esta materia por LC/MS.

V.2.5. Efecto de la temperatura del disolvente en la eficacia de la extracción.

La influencia de la temperatura del disolvente sobre la eficacia del proceso de extracción también fue evaluada. Para ello, tres temperaturas fueron estudiadas (25, 30 y 35°C) sobre aceitunas fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ que fueron tratadas bajo las condiciones anteriormente optimizadas. Sin embargo, no fueron encontradas diferencias significativas, de modo que no se tuvo en cuenta esta variable a la hora de realizar la extracción que fue llevada a cabo a la temperatura del laboratorio.

V.2.6. Condiciones óptimas derivadas del estudio de optimización.

Tras el estudio de optimización de los diferentes variables que influyen en el método de extracción propuesto, se seleccionaron como condiciones experimentales para la extracción de los analitos objeto de estudio en la presente memoria:

- ACN como disolvente de extracción
- Relación 1:1 (p/v), usando 30 g de aceitunas y 30 mL de ACN
- Velocidad de agitación mecánica de 750 opm
- Tiempo de agitación mecánica de 10 min
- La extracción se llevo a cabo a temperatura ambiente.

V.3. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ EN EL MÉTODO ASEL.

V.3.1. Evaluación del Efecto Matriz.

Los efectos de la matriz en sistemas *LC-MS* que trabajan con fuente de ionización por *electrospray* deben ser estudiados en matrices complejas como las aceitunas o el aceite de oliva. El *Efecto Matriz* se produce cuando otros componentes presentes en la matriz pasan al extracto y pueden llegar a interferir en la correcta ionización de las moléculas. Tales interferencias pueden dar lugar a un aumento o una disminución de la señal analítica, lo que haría difícil la correcta determinación y cuantificación de los plaguicidas.

Inicialmente, y debido al procedimiento de extracción propuesto, cabría pensar que el efecto de la matriz en el método propuesto sería de naturaleza suave, es decir, la cantidad de componentes presentes en la superficie de las aceitunas (ceras, triglicéridos, pigmentos, etc.) que podrían ser co-extraídos durante la agitación y que se incorporarían en el extracto final sería más bien pequeño, de modo que en principio, cabría pensar que no afectarían demasiado a la determinación de los pesticidas. Además, en un estudio anterior (*Apartado V.2.1.*) se comprobó que la cantidad de matriz que era extraída empleando como extractante el ACN era inferior a 2,5 mg de matriz en peso seco por cada gramo de aceitunas.

Sin embargo, aunque poca cantidad de matriz era extraída durante el proceso, no por ello se descartó la posible influencia de algunos de los

componentes presentes en la matriz sobre la cuantificación de los plaguicidas debida a tal efecto. Por esta razón, fue evaluado el efecto matriz del método ASEL a partir de la relación de pendientes obtenidas en las rectas de calibrado tanto en disolvente como en matriz, es decir, se procedió a calcular la relación de pendientes como el cociente entre la pendiente de la recta en matriz/pendiente de la recta en disolvente, para cada uno de los pesticidas en estudio.

Las rectas de calibrado tanto en matriz como en disolvente fueron elaboradas a partir del uso de mezcla de patrones de pesticidas preparados a las concentraciones de 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en ACN.

El posible efecto matriz fue cuantificado comparando las pendientes de las rectas de calibrado en disolvente ($m_{\text{disolvente}}$) o en matriz (m_{matriz}), y teniendo en cuenta la proporción entre ambas, llegando así a una clasificación preliminar del efecto de la matriz, de modo que

$$\text{Efecto Matriz} = 100 \times [1 - (m_{\text{matriz}}/m_{\text{disolvente}})]$$

En este sentido, y en base a la clasificación publicada en el año 2008 por B. Kmellár et al ¹⁹⁸, el *Efecto Matriz* fue clasificado en función del porcentaje de aumento o disminución de la pendiente. Así, fue considerado como *efecto matriz suave* cuando existe una relación de pendientes hasta el 20%, del 20 al 50 % podría ser considerado un *efecto matriz medio*, y con más del 50% podría ser considerado un *efecto matriz fuerte* que podría enmascarar la determinación correcta de los plaguicidas. Teniendo esto en

cuenta, se procedió a evaluar el *Efecto Matriz* a partir de aceitunas libres de pesticidas que fueron sometidas al procedimiento ASEL (tal y como quedó descrito en el apartado V.2.) siendo el extracto más tarde dopado con patrones de pesticidas a diferentes concentraciones dentro del rango lineal de 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla V.3.1.**

Todos los pesticidas estudiados mostraron supresión de la señal cromatográfica. El efecto matriz para algunos de los pesticidas como Diflufenican, TBA o Diuron podría ser considerado como un efecto matriz suave (**Figura V.3.1.**) de modo que los componentes de la matriz que han sido co-extraídos presentarían un menor impacto en la determinación de estos pesticidas.

Sin embargo, otros pesticidas como Clorpirifos, Dimetoato y Fosmet siempre deberían cuantificarse a través de calibrado en matriz (**Figura V.3.2.**), ya que su *Efecto Matriz* fue superior al 30% mientras que otros como Oxifluorfen y Amitrol fue extremadamente fuerte con más del 50% de supresión de la señal (**Figura V.3.3.**).

Como se aprecia en esta Figura, en el caso del Amitrol la presencia de la matriz provoca, además de una notable disminución en la pendiente, un apreciable aumento de la ordenada en el origen de la recta de calibrado. En el caso del Oxifluorfen, la interferencia de la matriz es de tal intensidad que prácticamente descarta la utilidad del método en el rango estudiado.

Tabla V.3.1. Parámetros correspondientes a las recta de calibrado en disolvente y en matriz. El rango lineal fue de 10-300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=5$). El efecto matriz viene expresado como relación entre la pendiente de la recta de calibrado en matriz y la pendiente de la recta en disolvente.

PESTICIDAS EN ESTUDIO	RECTA EN DISOLVENTE			RECTA EN MATRIZ			RELACIÓN DE PENDIENTES		
	Pendiente	Ordenada	(r^2)	Pendiente	Ordenada	(r^2)	Relación	Efecto	Tipo de Efecto
DIFLUFENICAN	84,20 (16)	143,57	0,9988	72,04 (12)	257,84	0,9984	0,86	14%	SUAVE
CLORPIRIFOS	16,81 (9)	-148,70	0,9971	10,28 (17)	36,42	0,9924	0,61	39%	FUERTE
FOSMET	333,92 (12)	1220,50	0,9980	217,81 (19)	-47,12	0,9995	0,65	35%	MEDIO
DIURON	321,87 (9)	-475,97	0,9986	256,07 (10)	196,09	0,9986	0,80	20%	SUAVE
TERBUTILAZINA	4212,60 (12)	15432,00	0,9985	3949,44 (12)	26604,00	0,9959	0,94	6%	SUAVE
DIMETOATO	302,26 (2)	544,51	0,9997	205,89 (12)	-396,72	0,9996	0,68	32%	MEDIO
AMITROL	30,69 (14)	208,62	0,9954	7,63 (21)	958,19	0,9991	0,45	75%	FUERTE
OXIFLUORFEN	14,32 (6)	17,91	0,9980	0,39 (54)	10,25	0,9587	0,03	97%	FUERTE

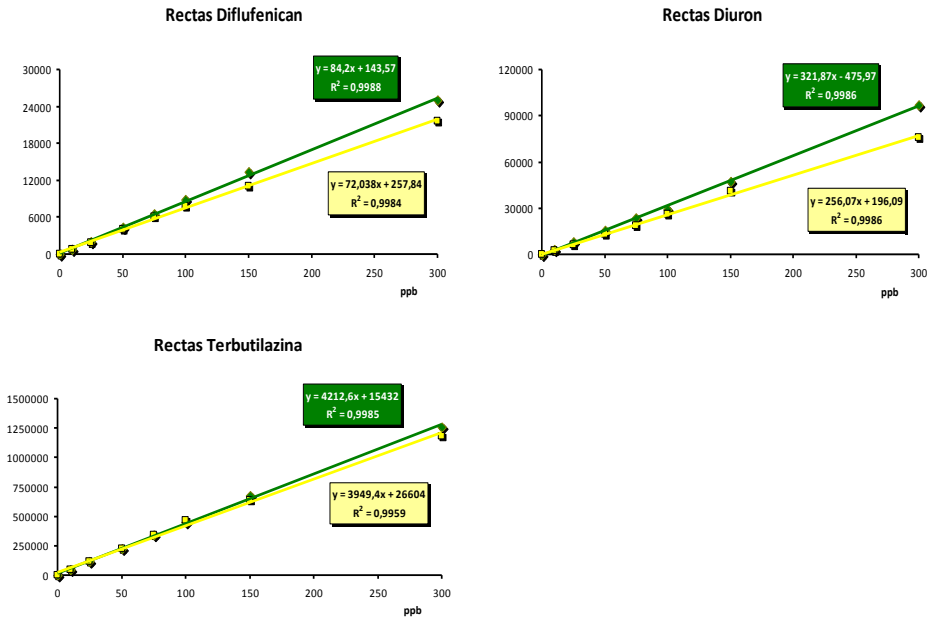


Figura V.3.1. Relación de pendientes en matriz y en disolvente para los pesticidas Diflufenican, Diuron y Terbutilazina con un *Efecto Matriz* “suave”, es decir, < 20%. Las rectas en color verde corresponden a las rectas en disolvente, mientras que las rectas en color amarillo representan las rectas de calibrado en matriz.

A la vista de estos resultados se comprueba la necesidad de calibrar en matriz para la correcta cuantificación del conjunto de materias activas objeto de la presente Memoria.

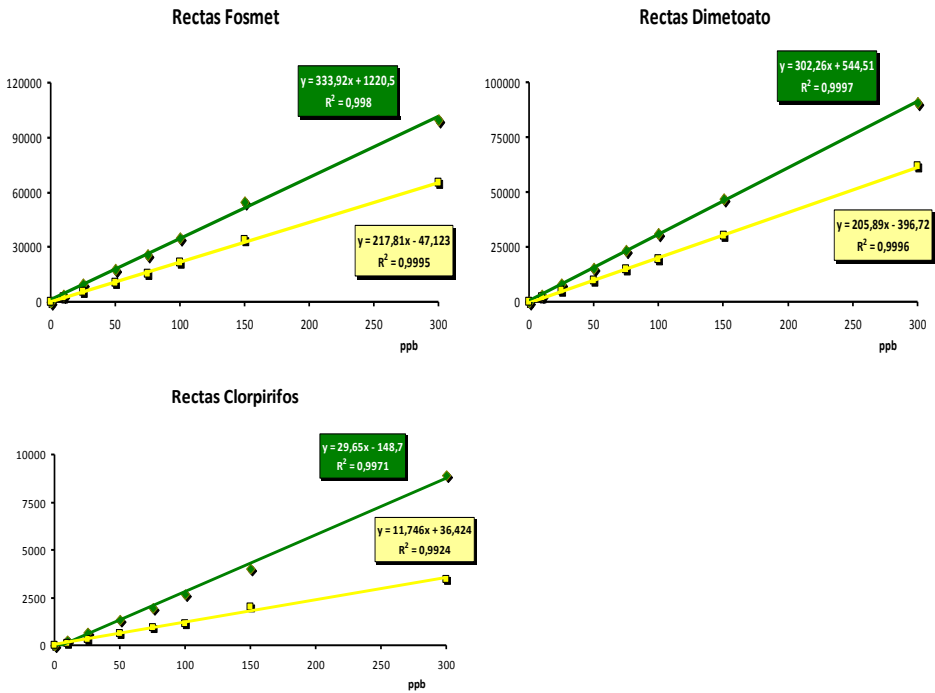


Figura V.3.2. Relación de pendientes en matriz y en disolvente para los pesticidas Fosmet Clorpirifos y Dimetoato con un *Efecto Matriz* “medio”, es decir, 20-50%. Las rectas en color verde corresponden a las rectas en disolvente, mientras que las rectas en color amarillo representan las rectas en matriz.

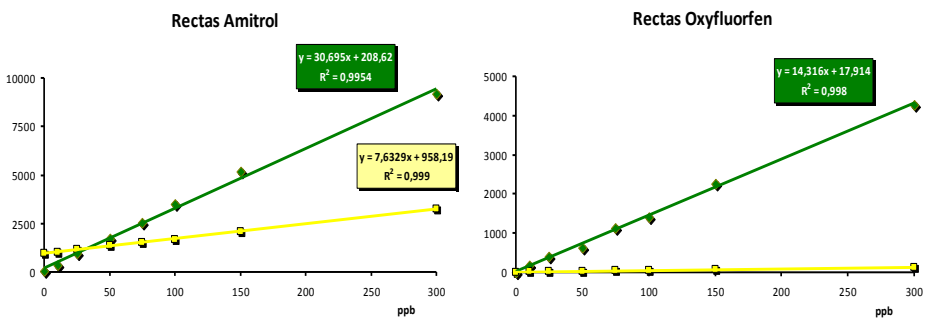


Figura V.3.3. Relación de pendientes en matriz y en disolvente para los pesticidas Amitrol y Oxifluorfen con un *Efecto Matriz* “fuerte”, es decir, > 50%. Las rectas en color verde corresponden a las rectas en disolvente, mientras que las rectas en color amarillo representan las rectas en matriz.

V.3.2. Estudio de los componentes presentes en la matriz del extracto.

V.3.2.1. Introducción.

A pesar de que desde el punto de vista cuantitativo la cantidad de matriz extraída por el método propuesto es reducida (ver **Tabla V.2.1.**), cualitativamente su efecto en la correcta determinación de los analitos es muy notable en varios de las materias activas objeto de este estudio, como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior. Por esta razón se procedió a estudiar la composición de la matriz extraída con el procedimiento propuesto.

Considerando el tipo de procedimiento de extracción superficial empleado, se procedió a estudiar la posible presencia de los siguientes componentes: grasa, ceras, polifenoles, triterpenos y pigmentos.

Todos los ensayos estudiados en el presente capítulo fueron realizados usando aceitunas de la variedad Picual con un nivel de maduración de 4,5 empleando las condiciones optimizadas del método ASEL durante el capítulo anterior que han sido resumidas en el *apartado V.2.6.* de la presente Memoria.

En el caso particular de la determinación de pigmentos, las aceitunas utilizadas fueron de diferente nivel de maduración, tal como se indicará en su apartado correspondiente.

V.3.2.2. Estudio del contenido en matriz.

La cantidad total de extracto obtenido por el método ASEL, expresada como residuo seco, se evaluó a partir del extracto obtenido en las condiciones estándar del método.

Una vez obtenido el extracto se tomó una alícuota de 25 mL del mismo y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. Por diferencia de peso se calculó el residuo seco total. El resultado medio obtenido ($n=5$) fue de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de aceituna.

V.3.2.3. Determinación de pigmentos totales.

La determinación del contenido total en pigmentos fue evaluada en base al método propuesto por *Minguez-Mosquera et al.* (1.990, 1.991)^{295,296} para la determinación de pigmentos totales en aceites de oliva.

Este método consiste, básicamente, en la realización de sendas medidas de absorbancia a una longitud de onda de 472 y 670 nm de una alícuota de aceite disuelto en ciclohexano. La medida a λ_{472} nm permite evaluar el contenido global en carotenos. La medida a λ_{670} nm permite conocer el contenido global de clorofilas y feofitinas.

Dado que el contenido de matriz total del extracto es claramente inferior a los 3 g de aceite que suelen pesarse para proceder al análisis de pigmentos según el método indicado, se procedió a concentrar el extracto de forma que se aumentase la sensibilidad. Para ello, se partió de un

extracto procedente de 300 g de aceitunas con dos niveles de maduración, por un lado entre 3,5 y por otro, 6,5 utilizando 300 mL de ACN.

A continuación, se tomó una alícuota de 50 mL del extracto obtenido y se llevó a sequedad en rotavapor, redisolviendo más tarde el residuo en 5 mL de ciclohexano. Para facilitar la redisolución, los balones fueron sonicados durante 2 min.

Antes de proceder a la lectura en el espectrofotómetro, los extractos concentrados fueron filtrados a través de filtros de 0,2 μm . Las determinaciones se hicieron por triplicado en cada uno de los niveles de maduración estudiados. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la **Tabla V.3.2**.

Tabla V.3.2. Contenido medio ($n=3$) de pigmentos en los extractos de aceitunas.

MUESTRAS	MADURACIÓN	CLOROFILAS (mg/L)	CAROTENOS (mg/L)	TOTAL (mg/L)
1		293,72	333,16	626,89
2	3.5	286,94	333,62	620,56
3		277,96	332,45	610,41
VALOR MEDIO (%RSDs)		286,21 (3)	333,08 (0,2)	619,29 (1,3)
1		217,55	338,47	556,02
2	6.5	204,64	338,47	543,11
3		215,87	337,65	553,52
VALOR MEDIO (%RSDs)		212,69 (3)	338,20 (0,1)	550,88 (1,2)

El contenido total de pigmentos expresado como suma de clorofilas y carotenos fue de 619 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en las muestras de nivel de maduración más temprano, frente a los 550 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en aceitunas más maduras.

V.3.2.4. Determinación de polifenoles totales.

La extracción y cuantificación de la fracción polifenólica de los extractos fue realizada mediante una adaptación del método descrito por Vázquez *et al.* (1973) ²⁹⁸. La cuantificación se realizó en base a la formación de un complejo coloreado con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados han sido expresados en ppm de ácido cafeico (mg ácido cafeico por kg de aceituna).

En el método de referencia se lleva a cabo en primer lugar, una extracción de los componentes polifenólicos con una mezcla hidroalcohólica. A continuación, una alícuota del extracto se derivatiza con el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico, llevándose a cabo posteriormente una lectura de absorbancia a 725 nm.

En la adaptación del método propuesto, se derivatizó en condiciones semejantes el extracto obtenido con ACN a partir de las aceitunas en estudio. El método utilizado siguió los siguientes pasos:

- a) Añadir 35 mL de agua en un matraz aforado de 50 mL
- b) Añadir 1 mL de extracto, homogenizar
- c) Añadir 2,5 mL de reactivo de Folin, homogenizar
- d) Añadir 5,0 mL de NaOH al 6%, homogenizar
- e) Enrasar con agua destilada.
- f) Esperar 15 min y leer la absorbancia a $\lambda=725$ nm.

Pasados los 15 min se observó que los matraces se enturbiaban notablemente, lo cual imposibilitaba la medida de la señal analítica. Este hecho podría ser debido a la diferente naturaleza de la muestra (en ACN) con respecto al procedimiento normal con mezcla MetOH:Agua.

Para comprobar este hecho, se procedió a realizar dos tipos de pruebas:

- MUESTRA A: 10 mL de extracto que fue evaporado y reconstituido en 10 mL de mezcla MetOH:Agua (60:40).
- MUESTRA B: 10 mL de extracto que fue evaporado y reconstituido en 10 mL de agua milliQ.

A los extractos así preparados se les aplicó el procedimiento de derivatización antes descrito, observándose de nuevo un enturbiamiento. A la vista de estos resultados se optó por filtrar el extracto original en ACN, una vez derivatizado, a través de 0,2 μm antes de realizar la lectura. En la **Figura V.3.4.** se representa la recta de calibrado del ácido cafeico en las condiciones descritas.

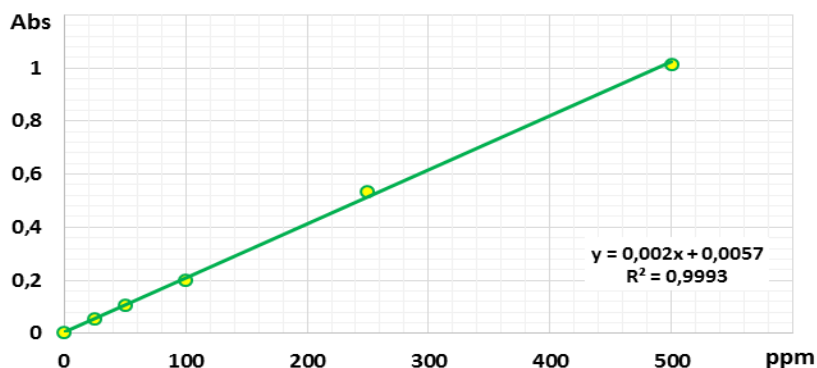


Figura V.3.4. Curva de calibrado del ácido cafeico por lectura espectrofotométrica a 725 nm.

Los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento descrito se recogen en la **Tabla V.3.3**.

Tabla V.3.3. Contenido en Polifenoles Totales ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de extractos en ACN ($n=5$).

MUESTRA	mg/L	Media	RSD
1	74,93		
2	78,95		
3	71,42	72,83	6%
4	69,41		
5	69,41		

A la vista de estos resultados se puede concluir que la cantidad de polifenoles presentes en el extracto es del orden de $73 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

V.3.2.5. Determinación de ceras.

Las ceras son ésteres de los ácidos grasos con alcoholes monovalentes lineales de cadena larga. Por lo tanto, las ceras son sustancias altamente insolubles en medios acuosos y a temperatura ambiente se presentan

sólidas. En vegetales las ceras recubren la epidermis de frutos, tallos, que junto con la cutícula o la suberina, evitan la pérdida de agua por evaporación en las plantas. En el caso de la aceituna, su piel está recubierta por una capa de ceras que representa más de la mitad de su peso ²⁹⁹ .

Según el *REGLAMENTO (UE) N° 61/2011 DE LA COMISIÓN* de 24 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, el contenido en ceras del aceite de oliva se determina mediante cromatografía de gases capilar, utilizando una metodología en la que la muestra, se fracciona en una columna de vidrio rellena de gel de sílice y la fracción eluida correspondiente a las ceras puede ser analizada.

Debido al carácter fuertemente apolar de las ceras, previsiblemente su concentración en el extracto obtenido con acetonitrilo será reducida.

Para el análisis de las ceras en el extracto procedente del método ASEL se tomaron 10 mL del extracto en ACN obtenido en las condiciones habituales y se llevaron a sequedad por evaporación a vacío y se reconstituyeron con 10 mL de *n*-hexano. A continuación, este extracto reconstituido se analizó siguiendo el método oficial antes citado. Los resultados obtenidos al analizar el contenido en ceras del extracto aplicando el procedimiento indicado se muestran en la **Tabla V.3.4**.

Tabla V.3.4. Concentración en ceras del extracto en ACN.

Compuesto	Concentración (mg·L ⁻¹)
C40:2	18,78
C42:1	20,87
C44:1	3,62
C46	2,86
Total	46,12

V.3.2.6. Determinación de compuestos triterpénicos.

La piel (epicarpio) de la aceituna es rica en ácidos triterpénicos, fundamentalmente ácido maslínico y oleanólico, y en menor medida en alcoholes triterpénicos, principalmente eritrodiol y uvaol ²⁹⁹.

Para su determinación se ha empleado el método recientemente descrito por *Fernández-Hernández et al.* ³⁰⁰ para el análisis de éstos compuestos en orujos basado en el análisis directo del extracto por UPLC-MS/MS.

El extracto obtenido en las condiciones habituales fue filtrado a través de 0,2 µm y analizado por UPLC-MS. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la **Tabla V.3.5.**

Tabla V.3.5. Concentración media (RSDs) de triterpenos del extracto en ACN (n=3).

Triterpeno	Ac. Maslínico	Ac. Oleanólico	Ac. Ursólico	Uvaol	TOTAL
mg·L ⁻¹	40,50 (6)	12,86 (25)	21,11 (3)	1,52 (0,4)	75,99

V.3.2.7. Determinación de la grasa total.

Para determinar el contenido graso total de los extractos se tomó como métodos de partida los métodos estándar de determinación del contenido graso en aceitunas y orujos mediante desecación previa y extracción con Soxhlet empleando como disolvente *n*-hexano (métodos UNE 55030 y 55031).

Para calcular la cantidad de grasa que contiene el extracto, dado que en este caso la muestra está disuelta en ACN, se llevó a cabo un paso previo de adsorción sobre gel de sílice. Para ello, 25 mL de extracto fueron introducidos en un balón que previamente contenía 10 g de silicagel. A continuación, se mantuvo media hora en agitación constante de 250 rpm.

Una vez adsorbido el extracto se procedió a la eliminación del disolvente en rotavapor a 40 °C. Finalmente, se dejó enfriar la silicagel en un desecador, y se procedió a introducirla en un equipo Soxhlet para su extracción. Los resultados obtenidos a través de 3 muestras se muestran en la **Tabla V.3.6**.

Tabla V.3.6. Cantidad de grasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) presente en el extracto de ACN ($n=3$).

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
g de grasa	0,026	0,021	0,023
mL de extracto	25,00	25,00	25,00
$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1020,41	836,73	918,37
Media (RSDs)		925 (10)	

V.3.2.8. Composición del extracto.

A modo de recopilación en la **Tabla V.3.7.** se resume el contenido en los diferentes grupos de compuestos del extracto estudiados en el presente capítulo (pigmentos, polifenoles, ceras, triterpenos y grasa total).

Tabla V.3.7. Componentes presentes en la matriz del extracto procedente del método ASEL.

	Pigmentos	Polifenoles	Ceras	Triterpenos	Grasa Total
mg/L	619,29	72,83	46,12	75,99	925
% en extracto	25%	3%	2%	3%	37%

V.4. EFECTO DE LA PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS.

En general, en los procedimientos de extracción y determinación de residuos de pesticidas en matrices grasas como las aceitunas, es necesario aplicar procedimientos de limpieza, purificación o *clean up* en los extractos para paliar los problemas de sensibilidad en su determinación producidos a consecuencia de un efecto matriz que genera graves interferencias en los sistemas de detección empleados.

En el caso de los pesticidas objeto de estudio, se comprobó en el apartado anterior que existía efecto matriz en los extractos procedentes del método ASEL, por lo que se procedió a estudiar si la incorporación de una etapa de purificación de los mismos reduciría dicho efecto matriz a la vez que se reduciría el ensuciamiento de las columnas y los sistemas de detección por su uso en rutina.

Para ello, fueron seleccionados dos procedimientos de purificación que son empleados habitualmente en la determinación de residuos de pesticidas en matrices grasas, concretamente en aceitunas.

Por un lado, fue ensayado el procedimiento de purificación empleado en el método *QuEChERS* publicado por *S. Cunha & S. Lehotay* en el año 2007²¹⁵. Por otro lado, fue ensayado un procedimiento por *extracción en fase sólida* empleando columnas de Florisil, basado en los métodos descritos por *C. Ferrer et al.* (2005)¹⁸⁶ y *Aramendía et al.* (2007)¹⁸⁴.

V.4.1. Purificación a través de la mezcla de adsorbentes del método *QuEChERS*.

Existen muchos tipos distintos de *QuEChERS* como ya se puso de manifiesto durante la *Introducción*, pero en el caso concreto de la determinación de pesticidas en aceitunas se ha descrito el método *QuEChERS* publicado por *S. Cunha* y *S. Lehotay* en el año 2007 en la revista "*Journal of Separation Science*" ²¹⁵.

Atendiendo a lo descrito en dicha publicación se procedió a purificar los extractos de modo que 1 mL de extracto fue introducido en un tubo *ependorf* que previamente contenía una mezcla de cuatro adsorbentes, $MgSO_4$ *anhidro*, PSA, GCB y C_{18} en cantidades de 150, 50, 50 y 50 mg, respectivamente.

El tubo *ependorf* fue agitado vigorosamente durante 20 s y a continuación fue centrifugado 1 min a 3450 *rcf*. El sobrenadante resultante quedó lo suficientemente limpio como para poder ser inyectado directamente en el sistema UPLC-MS/MS. Sin embargo, por precaución, al extracto obtenido se le hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μm antes de su introducción en el sistema cromatográfico.

El ensayo fue realizado a partir de muestras de aceitunas previamente fortificadas a 250 $\mu g \cdot kg^{-1}$ a las que se les aplico el método ASEL en las condiciones optimizadas anteriormete. Los pesticidas Clorpirifós y

Oxifluorfen no fueron evaluados en este estudio. Los resultados para los extractos con o sin *clean up* se pueden ver gráficamente en la **Figura V.4.1**.

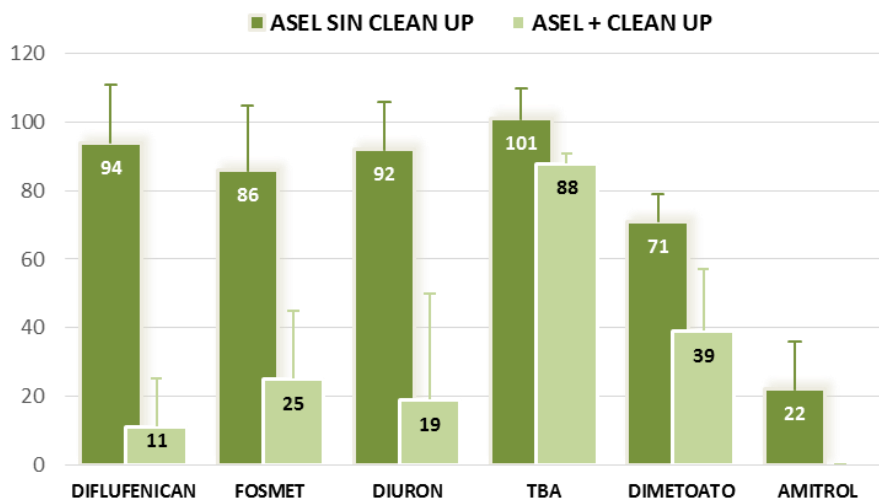


Figura V.4.1. Recuperaciones obtenidas ($n=5$) por extracción ASEL con y sin etapa de purificación de extractos del método *QuEChERS* a partir de muestras fortificadas a $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

A la vista de los resultados, se puede apreciar que se produjo un descenso importante en los porcentajes de recuperación al aplicar el proceso de purificación. El descenso más acusado en la recuperación por efecto de la etapa de *clean up* se dio en el Diflufenican.

También se produjeron importantes pérdidas en el Diuron, Fosmet o el Dimetoato con respecto al extracto sin purificar, mientras que la recuperación de la TBA se vió afectada en menor medida por la aplicación de adsorbentes al extracto.

De este modo, se puede concluir que el resultado del proceso de purificación del método *QuEChERS* ensayado para limpiar los extractos no fue satisfactorio, generando pérdidas muy importantes a la hora de cuantificar los pesticidas, lo cual puede ser debido a que parte de los pesticidas presentes en los extractos quedan retenidos cuando son sometidos al contacto con la mezcla de adsorbentes.

V.4.1.1. Inhibición de la señal cromatográfica por efecto de los adsorbentes.

V.4.1.1.1. Introducción e hipótesis.

Dado que la introducción de una etapa de purificación de los extractos por medio del *clean up* del método *QuEChERS* dio lugar a una reducción importante del porcentaje de recuperación en muestras fortificadas, se procedió a comprobar cuál era el motivo de tal disminución.

Para ello, la hipótesis se centró en la comprobación de la diferente afinidad de los adsorbentes empleados por los pesticidas presentes en una matriz con mayor contenido graso, como cabría esperar en los extractos procedentes de la etapa de extracción del *QuEChERS* cuando éste es aplicado en pasta de aceituna molida, frente a los procedentes del método *ASEL* con bajo contenido graso.

Los adsorbentes empleados en el *clean up* se utilizan en los extractos porque tienen afinidad por las materias grasas pero en ausencia de ellas, como ocurre en los extractos procedentes del método *ASEL*, adsorberían a

los pesticidas, afectando a su extracción y disminuyendo de esta manera a sus porcentajes de recuperación.

Teóricamente, al realizar el *clean up* sobre pasta de aceituna molturada esto no ocurriría, ya que la afinidad de los absorbentes por la materia grasa sería mayor que para los pesticidas, de modo que los absorbentes se adhieren al aceite y no absorberían pesticidas, dando lugar a mejores resultados de recuperación.

V.4.1.1.2. Parte Experimental.

Para comprobar si los absorbentes del método QuEChERS retienen o no a los pesticidas, se simuló un método QuEChERS en disolvente, realizando una saturación del ACN con aceite. Para ello, fueron preparadas por un lado la mezcla A: solución de aceite en *n-hexano* al 34%, y por otro la disolución B: disolución patrón de pesticidas en ACN a $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Diferentes cantidades de A y B fueron mezcladas en un embudo de decantación hasta conseguir un extracto de ACN rico en aceite que se asemejase lo más posible al extracto procedente del método *QuEChERS* original. Así se establecieron tres tipos de muestra problema:

- Muestra Blanco, 25 mL de ACN y 10 mL de mezcla A,
- Muestras Problema con saturación en aceite, 25 mL de B y 10 mL de A,
- Muestras Problema sin saturación en aceite, con 25 mL de disolución B.

Todas las muestras fueron introducidas en embudos de 250 mL que fueron agitados durante 1 min antes de proceder a la decantación. Se

recuperó la fase con ACN y se desechó la fase hexánica. Sin embargo, pequeñas gotas de hexano quedaron suspendidas en la fase orgánica, y por ello se sometió a los extractos a una etapa de centrifugación de modo que se consiguiera separar ambas fases completamente.

De los aproximadamente 24 mL de extracto recuperado, se tomaron 10 mL y se les sometió al *clean up* del método QuEChERS adaptado al volumen de extracto. Así, cada uno de los tubos de centrífuga contenían: 1.5g MgSO₄ + 0.5g PSA + 0.5g GCB + 0.5g C₁₈. Tras la centrifugación a 3450 rcf (5550 rpm) los extractos fueron filtrados por 0,2 µm y depositados en viales de cromatografía.

Finalmente, cada uno de los tipos de muestras fueron analizadas en su correspondiente recta matriz y se evaluó tanto el *Efecto Matriz* como los respectivos porcentajes de recuperación.

V.4.1.1.3. Influencia en el Efecto Matriz.

Para analizar el comportamiento de los pesticidas por interacción con los absorbentes del *clean up*, para cada uno de los pesticidas fue estudiado el impacto que tienen en las pendientes de las rectas de calibrado en función de la cantidad de matriz (ACN saturado en aceite al 34%) y en ausencia de ella.

Los valores de las pendientes de las rectas en disolvente con (recta C) o sin *clean up* (Recta A) y las correspondientes a las pendientes de rectas

con saturación en aceite con clean up QuEChERS (Recta B) se muestran en la **Tabla V.4.1.**

Se puede observar que en ausencia de matriz oleosa el efecto del proceso de purificación daría lugar a una gran disminución de la pendiente (relación A/C), mostrándose pérdidas del 20-65% de la señal cromatográfica. Se puede concluir que los adsorbentes empleados en este procedimiento de *clean up* retienen los analitos de interés. Es pues evidente, que parte de los adsorbentes del clean up empleado ejercerían un efecto contrario al deseado en ausencia de matriz.

Tabla V.4.1. Efecto Matriz y relación de pendientes en rectas procedentes de diferentes tratamientos: A, recta en disolvente sin tratamiento de *clean up*; B, recta procedente de extractos con saturación de ACN en aceite sometida a *clean up*; C, recta en disolvente sometida a *clean up*.

PESTICIDAS	RELACION DE PENDIENTES					
	A. RECTA (DISOLVENTE)	B. RECTA (SAT.ACEITE)	C. RECTA (A+clean up)	RATIO A/B (%)	RATIO A/C (%)	RATIO B/C (%)
DIFLUFENICAN	85,52	82,76	30,44	3%	64%	63%
CLORPIRIFOS	16,24	19,94	12,57	-23%	23%	50%
FOSMET	202,07	217,56	157,36	-8%	22%	28%
DIURON	371,45	288,71	229,63	22%	38%	20%
TBA	4096,30	3972,10	2770,20	3%	32%	30%
DIMETOATO	321,82	322,78	144,22	0%	55%	55%
AMITROL	24,43	24,30	18,42	1%	25%	24%

4.1.1.4. Influencia en las recuperaciones.

Una vez estudiado el efecto de los adsorbentes en las pendientes de las rectas se analizaron los porcentajes de recuperación para una disolución

patrón $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en ACN. Dicha disolución fue sometida a dos tipos de tratamientos, por un lado se le practicó una saturación con aceite al 34% más *clean up* y por otro, se sometió a *clean up* sin previa saturación en aceite. Los resultados se muestran a continuación en la **Tabla V.4.2**.

Tabla V.4.2. Efecto sobre la recuperación ($n=5$) a causa de la presencia o ausencia de grasa en los extractos sometidos al procedimiento de *clean up* del método *QuEChERS*.

PESTICIDAS	EXTRACTO SIN SATURACION EN ACEITE		EXTRACTO CON SATURACION EN ACEITE		% PERDIDA
	Recuperación	RSD	Recuperación	RSD	
DIFLUFENICAN	1%	18%	87%	9%	86%
CLORPIRIFOS	25%	4%	91%	21%	66%
FOSMET	22%	5%	108%	2%	86%
DIURON	20%	7%	97%	2%	77%
TBA	95%	3%	104%	1%	9%
DIMETOATO	114%	2%	101%	1%	-13%
AMITROL	4%	16%	7%	7%	3%

A la vista de los resultados, en pesticidas como Diflufenican, Clorpirifos, Fosmet o Diuron existe una reducción en las recuperaciones que oscila entre el 66-86% debida al efecto de los adsorbentes en ausencia de matriz oleosa. Sin embargo, dicha reducción no se produciría en aquellas muestras que fueron saturadas en aceite, mostrando valores de recuperación cercanos al 100%.

Otros pesticidas como TBA o el Dimetoato no se ven tan afectados por este hecho, y prácticamente no alterarían su porcentaje de recuperación final por la presencia o no de grasa en el extracto a purificar. En el caso del

Amitrol, por ambos métodos existe una importante pérdida por interacción con los adsorbentes tanto en ausencia como en presencia de grasa.

A la vista de estos resultados, el método de limpieza propuesto por el método *QuEChERS* publicado por *S. Cunha et al.*²¹⁵ (2007) no sería apropiado para la determinación del conjunto de pesticidas seleccionados en la presente Memoria en extractos procedentes del método ASEL.

V.4.2. Purificación de los extractos a través de Florisil.

Para comprobar la validez del Florisil en la limpieza de los extractos se tomaron como referencia los procedimientos descritos por Aramendía.¹⁸⁴ y Ferrer.¹⁸⁶

La etapa de purificación con Florisil del extracto de pesticidas obtenido por el método ASEL fue llevado a cabo empleando columnas empaquetadas de 2g de Florisil (*12 mL Bond-Elut-Varian minicolumn, Varian Inc.*) las cuáles fueron previamente activadas con un volumen de MetOH y posteriormente acondicionadas con dos volúmenes de ACN. En dichas columnas fueron introducidos 10 mL del extracto obtenido por el procedimiento ASEL.

V.4.2.1. Cantidad de Matriz retenida por el Florisil.

De forma preliminar al estudio del efecto de la purificación de los extractos a través de columnas de Florisil, se evaluó la cantidad de matriz que es retenida por el paso a través de este adsorbente.

Para ello, se tomaron 30 g de aceitunas de la *var. Picual* y se les sometió al método ASEL con 30 mL de ACN, obteniéndose aproximadamente 30 mL de extracto que fueron filtrados por 0,2 μm . A continuación, 10 mL fueron llevados a sequedad con ayuda de un sistema de evaporación a vacío. La cantidad de matriz obtenida expresada como residuo seco fue de 2,3 mg de matriz por cada 1 g de aceituna tratada.

Para evaluar la cantidad de matriz que queda retenida por el Florisil, se siguió el mismo procedimiento pero previamente los extractos fueron pasados a través de columnas de Florisil obteniéndose 0,64 mg/g de extracto. Por lo tanto, la etapa de purificación del extracto usando columnas de Florisil dio lugar a una disminución del 72% del contenido en matriz.

V.4.2.2. Efecto sobre las pendientes de las rectas de calibración.

Para comprobar el efecto del Florisil las rectas de calibración, fueron realizadas tres tipos de rectas: una recta en disolvente con ACN, una recta calibrada en matriz procedente del método ASEL y una recta en matriz purificada a través de Florisil.

A la vista de la reducción del contenido en matriz a consecuencia del paso por florisil, cabría esperar que los valores de las pendientes de las rectas de calibrado fuesen más próximos a los valores de pendiente de la recta en disolvente.

Los resultados de las rectas evaluadas se muestran en la **Figura V.4.2.** donde se puede apreciar una tendencia a la disminución del valor de la pendiente por efecto matriz de las rectas ASEL con respecto a las de las rectas en disolvente, tal y como se evaluó en el *apartado V.3.1. Evaluación del Efecto Matriz.* Dicha supresión de la señal es más marcada en unos pesticidas que en otros, siendo inexistente en el caso del Diflufenican, pero observando una clara influencia en el caso del Amitrol.

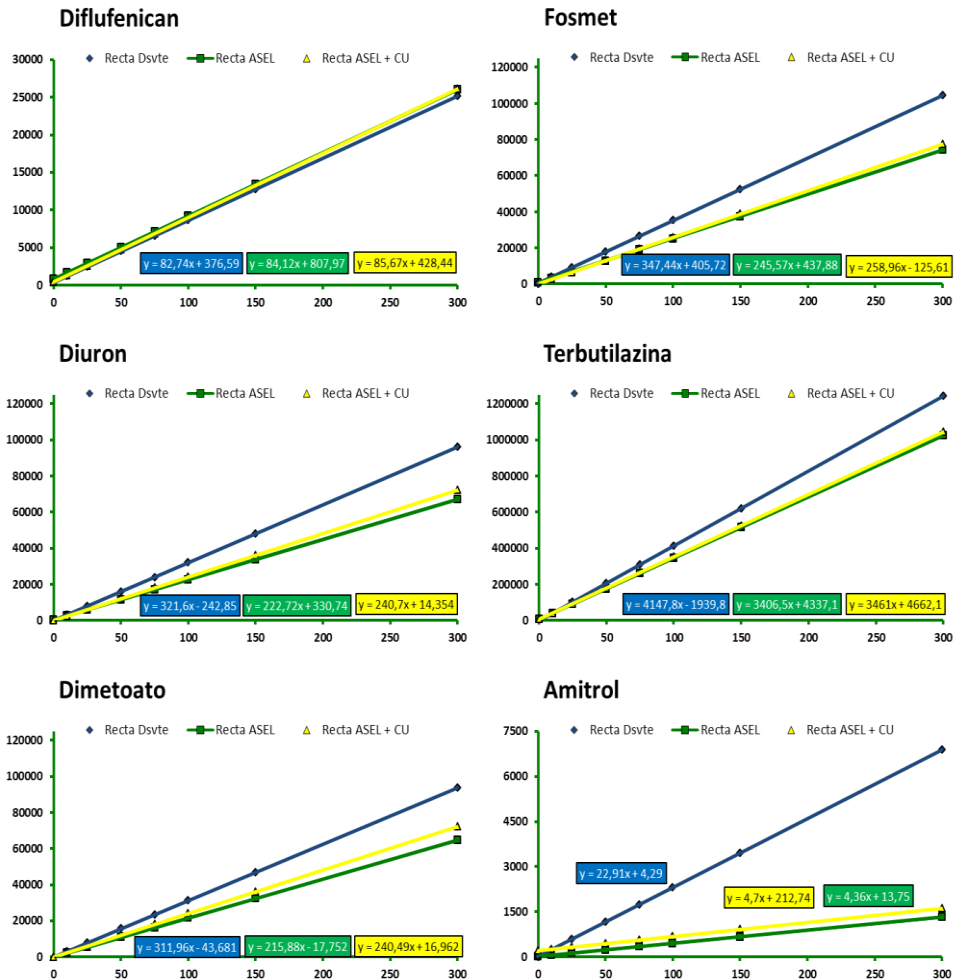


Figura V.4.2. Comparación de rectas calibradas en disolvente y en matriz ASEL con o sin paso por Florisil. Las figuras corresponden a las rectas medias ($n=5$) de los pesticidas Diflufenican, Fosmet, Diuron, Terbutilazina, Dimetoato y Amitrol.

La tendencia de las rectas ASEL con etapa de purificación es también de supresión de la señal con respecto al disolvente y con unas diferencias en los valores de pendiente prácticamente inapreciables con respecto a las

rectas procedentes de extractos sin etapa de purificación. Este hecho pone de manifiesto que el Florisil aun reteniendo parte de la matriz, no da lugar a una reducción sustancial del efecto matriz.

V.4.2.3. Efecto sobre los porcentajes de recuperación.

A continuación, fueron evaluados los porcentajes de recuperación medios obtenidos a partir de muestras fortificadas en disolución a $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Para ello, se introdujo en el frasco de extracción 30 g de aceitunas y 30 mL de una disolución de pesticidas en ACN al citado nivel de concentración. Las muestras así preparadas se sometieron a las condiciones del método ASEL optimizadas anteriormente.

De cada uno de los extractos de las muestras se tomaron dos alícuotas de 10 mL, una fue directamente analizada en el UPLC-MS/MS y la otra fue sometida a purificación a través de Florisil. Los resultados medios son mostrados gráficamente en la ***Figura V.4.3.***

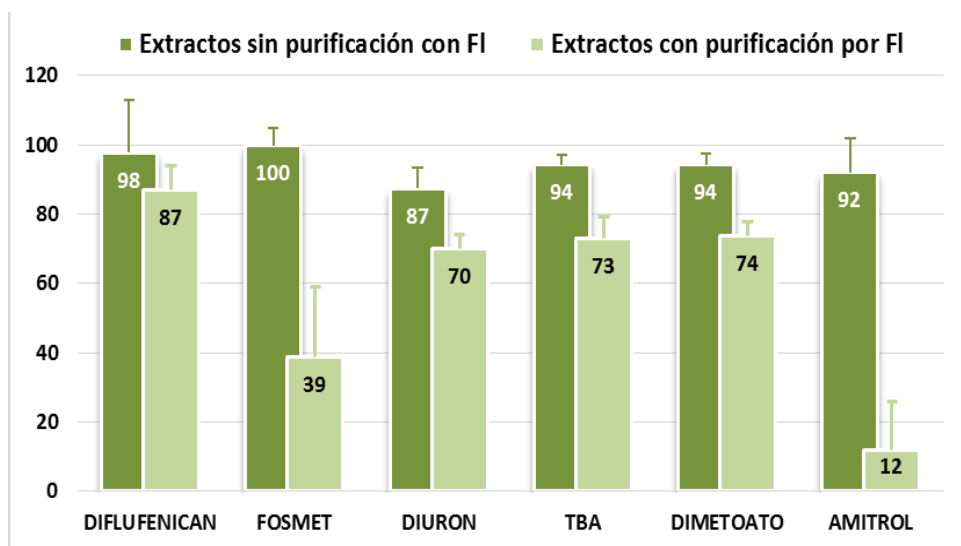


Figura V.4.3. Porcentajes de recuperación medios ($n=5$) para muestras fortificadas en disolución a $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sometidas a tratamiento ASEL con o sin etapa de purificación con Florisil.

A la vista de los resultados se puede observar que en todos los pesticidas el paso por Florisil disminuyó sensiblemente la cantidad de pesticida recuperado. En la **Figura V.4.3.** se puede observar gráficamente este descenso que va desde una pérdida del 11% para el Diflufenican hasta cerca de un 60% en el caso de Fosmeto del 87% para el Amitrol. Otros pesticidas no sufrieron tanto este efecto como la TBA con pérdidas de un 10% o el Diuron con un 17%.

V.4.2.4. Efecto del Lavado de las columnas de Florisil.

En el apartado anterior se observó que la incorporación de una etapa de purificación a través de columnas de Florisil producía pérdidas en la cuantificación de los pesticidas de interés. El origen de ésta pérdida podría

ser fruto de una mala optimización de las variables del proceso, es decir, es posible que sea consecuencia de una retención de los analitos por parte del Florisil y que el descenso de la recuperación sea resultado de una mala elección del volumen de elución para el lavado de las columnas. De este modo, se trató de optimizar el volumen de ACN para lavar las columnas de Florisil, variando la cantidad de eluyente.

Para realizar este estudio fueron realizadas seis extracciones a partir de 6 muestras de 30 g de aceitunas libres de pesticidas con 30 mL de ACN. A continuación, los extractos fueron filtrados por 0,2 μm y se recuperaron aproximadamente 161 mL de extracto de un total de 181 g de aceitunas tratadas.

100 mL del extracto fueron fortificados con disoluciones patrón de pesticidas en ACN hasta alcanzar una concentración final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Los 61 mL restantes del extracto fueron utilizados para elaborar las correspondientes recta patrón en matriz con o sin pasar por Florisil.

Para el ensayo fueron utilizadas un total de 15 columnas de Florisil en las que una vez acondicionadas, se introdujeron 10 mL de extracto fortificado a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, y posteriormente, fueron lavadas con cantidades crecientes de ACN de 0, 5, 10, 15 y 20 mL de ACN. Cada una de las purificaciones fue realizada por triplicado.

Todos los extractos una vez purificados, fueron llevados a sequedad a través del rotavapor. Los extractos secos fueron reconstituidos con 5 mL de

ACN. Tras la inyección en el equipo de UPLC-MS/MS cada uno de los analitos fue interpolado en su recta patrón en matriz correspondiente. Los resultados pueden verse resumidos gráficamente en la **Figura V.4.4**.

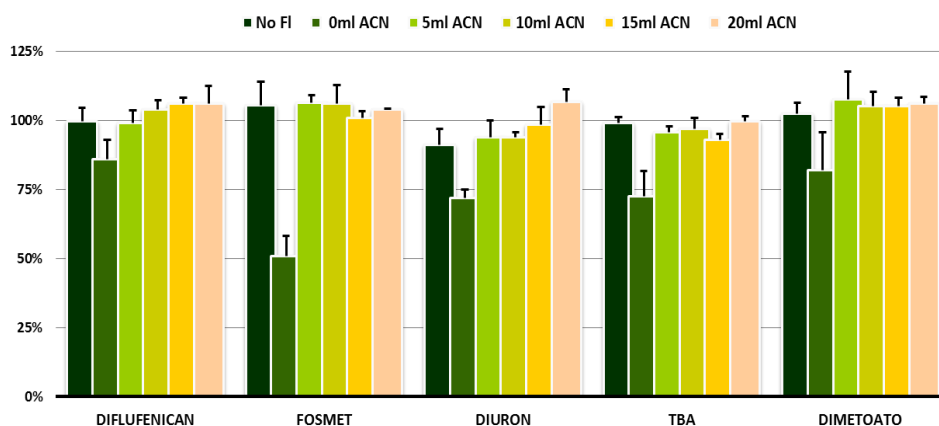


Figura V.4.4. Recuperaciones medias ($n=3$) en función del volumen de lavado en muestras fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ con y sin etapa de purificación por Florisil. Las columnas fueron lavadas con diferentes cantidades de ACN. Los pesticidas Clorpirifos, Amitrol y Oxifluorfen no fueron evaluados en este estudio.

A la vista de los resultados se puede comprobar que el paso de los extractos a través del Florisil deja retenida cierta cantidad de los pesticidas en el adsorbente, por lo que se hace necesario pasar un determinado volumen de ACN para eluir los pesticidas que quedaban retenidos. Los resultados demostraron que un volumen de 5 mL de ACN sería suficiente para recuperar la totalidad de los pesticidas presentes en el extracto.

V.4.2.5. Cantidad de matriz co-eluida tras el lavado de las columnas

La tendencia en los valores de recuperación para los extractos fortificados a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pasados a través de columnas de Florisil fue de aumentar conforme se incrementaba el volumen de lavado.

Para corroborar la efectividad del paso de 5 mL de ACN para recuperar la totalidad de los pesticidas así como de retener más del 70% de matriz, se llevó a cabo la evaluación del contenido en matriz de los extractos pasados por las columnas de Florisil tras ser eluidos con volúmenes diferentes de ACN. Para ello, se utilizaron un total de 7 columnas de Florisil y en cada una de ellas fueron purificados 10 mL de extracto ASEL, cuya matriz fue eluida con volúmenes de ACN entre 0 y 20 mL.

Además, también fue estimada la cantidad de matriz que tenía el extracto sin paso por Florisil. La cantidad de matriz se estimó en función de la diferencia de peso antes y después de la evaporación de los extractos. Los resultados se muestran en la **Figura V.4.5**.

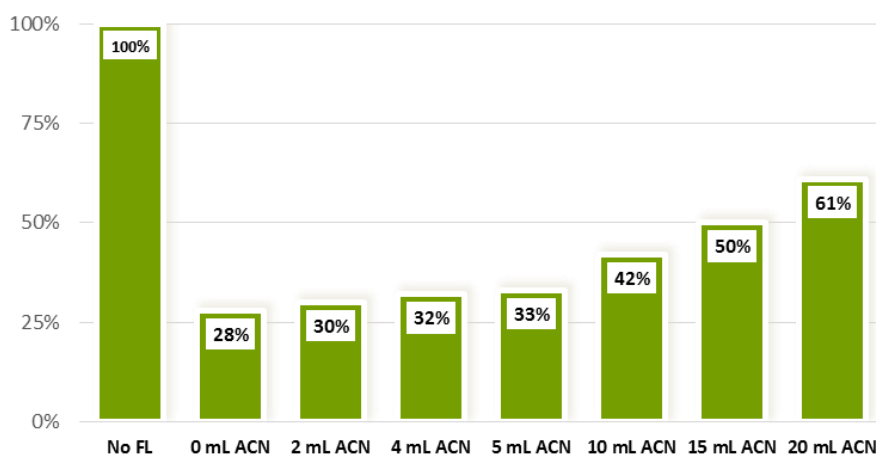


Figura V.4.5. Porcentajes de matriz co-eluída a partir de extractos purificados con Florisil que fueron posteriormente lavados con diferentes cantidades de ACN.

Finalmente, se puede concluir que la introducción de una etapa de purificación de los extractos con Florisil no mejora las recuperaciones del método propuesto, sino que las mantiene, pero si elimina gran cantidad de la matriz que podría interferir en los equipos de medida.

V.5. INFLUENCIA DEL ESTADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOS PESTICIDAS.

V.5.1. Introducción.

En la literatura existen muchos estudios sobre la influencia del estado de maduración de las aceitunas sobre su composición y la calidad del aceite de oliva resultante, sin embargo, para nuestro conocimiento no se ha evaluado si dicho estado de maduración podría afectar a la determinación de los pesticidas eventualmente presentes en ellas.

Con el fin de conocer la influencia del estado de maduración de las aceitunas sobre la determinación de la contaminación superficial por residuos de pesticidas se procedió a la evaluación del Efecto Matriz a partir de dos tipos de estudios. Por un lado, se estudió el Efecto Matriz a partir de la cantidad de matriz co-extraída y por otro, a través del estudio de la influencia en las pendientes de las rectas de calibración en matriz procedentes de extractos a diferentes niveles de maduración.

Además, fue objeto de este estudio conocer en qué medida dicha influencia podría afectar en dos métodos de extracción, el método propuesto en la presente Memoria (*ASEL*) y el método tomado como referencia (*QuEChERS*).

V.5.2. Parte experimental: Muestras y metodología empleada.

Para realizar este estudio fueron recogidas aceitunas de la variedad *Picual* en diferentes estados de maduración (valores de índice de madurez de 1 hasta 7). De cada clase, se tomaron dos kilos, uno fue utilizado para evaluar la influencia del estado de maduración en la determinación por el método *ASEL*, mientras que el otro kilo fue molturado y empleado con el mismo objetivo pero empleando el método de referencia *QuEChERS*. Ambos tipos de muestra, aceitunas y pasta, fueron congeladas hasta su posterior análisis (**Tabla V.5.1.**).

Tabla V.5.1. Muestras seleccionadas para el análisis de la influencia del estado de maduración. En la tabla se muestran la fecha de recogida y el estado de maduración de las aceitunas seleccionadas para cada uno de los dos métodos de extracción.

MUESTRA	CLASE	RECOGIDA	ASEL	QuEChERS
			ACEITUNA	PASTA
M 1	1	16/10/2010	SI	SI
M 2	2	06/11/2010	SI	SI
M 3	3	17/11/2010	SI	SI
M 4	5	13/12/2010	SI	SI
M 5	7	10/02/2011	SI	NO
M 6	6	10/02/2011	SI	NO
M 7	7	10/02/2011	NO	SI

V.5.2.1. Influencia de la maduración en el método *ASEL*.

Para comprobar si el estado de maduración de las aceitunas influía en la determinación de los pesticidas por el método *ASEL* se procedió a dos tipos de estudios. Por un lado, se estudió el efecto supresor de la matriz en

todos los estadios a través de la evaluación las pendientes de las rectas de calibrado generadas en cada estadio. Por otro parte, también fue estimada la cantidad de matriz o extracto seco que se extrae a partir de cada estado de maduración por el método propuesto.

Para ello, se realizaron un total de 7 tipos de rectas, 6 correspondientes a cada uno de los estados de maduración en estudio y 1 recta en disolvente. El rango de concentraciones empleado fue desde 0 hasta $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Cada una de las rectas fue realizada por triplicado para cada índice de madurez.

V.5.2.2. Influencia de la maduración en el método QuEChERS.

Para realizar este ensayo fueron empleados 5 estados de maduración, correspondientes a los estados 1, 2, 3, 5 y 7, respectivamente. La pasta de aceitunas para los índices de madurez 4 y 6 no fue evaluada ya que no se dispuso de la cantidad suficiente de muestra para el ensayo.

Con el fin de obtener la cantidad de matriz necesaria para realizar el estudio de las rectas patrón de cada uno de los distintos índices de maduración, se molieron 1000 g de aceitunas, y en lugar de tomar 10 g de pasta de aceitunas con 10 mL de ACN, tal y como describe el procedimiento original, se utilizaron 20 g de pasta y 20 mL de ACN, que fueron mezclados con 2 g de NaCl y 8 g de MgSO_4 anhidro. Este proceso fue repetido 3 veces para cada estado de maduración hasta conseguir aproximadamente 60 mL de extracto.

A continuación, el extracto fue sometido a purificación tal y como describe el método, pero en lugar de utilizar un *Eppendorf* donde se introduce 1 mL del extracto, fueron utilizados tubos de centrífuga de 50 mL que contenían previamente la cantidad equivalente para 25 mL del método que eran: 3,75 g de MgSO_4 anhidro + 1,25 g PSA + 1,25 g C_{18} + 1,25g GCB. En cada uno de los tubos de centrífuga fueron introducidos 25 mL de extracto, para conseguir un extracto limpio tras la etapa de centrifugación de aproximadamente 20 mL. Este proceso se hizo por duplicado, obteniéndose aproximadamente 40 mL de extracto para cada estado de maduración.

Finalmente, fueron realizadas un total de 6 tipos de rectas, 5 correspondientes a cada uno de los estados de maduración en estudio y 1 recta en disolvente. Cada una de las rectas procedentes del *QuEChERS* fue realizada por triplicado.

De igual modo fue estimada la cantidad de matriz o extracto seco que se extrae a partir de cada estado de maduración por el método *QuEChERS*.

V.5.3. Análisis y discusión de resultados.

V.5.3.1. Resultados para método ASEL.

V.5.3.1.1. Influencia en la pendiente.

Para dilucidar cómo afecta el estado de maduración se procedió a evaluar la tendencia de las pendientes de las rectas calibradas en

matriz de cada uno de los estados de maduración ensayados. En la **Figura V.5.1.** se muestran las gráficas correspondientes a la *Evolución de las pendientes medias en cada nivel de maduración* para cada uno de los pesticidas en estudio, mientras que en la en la **Tabla V.5.2.** se muestran los valores de pendiente, ordenada en el origen y R^2 correspondientes a cada una de ellas, así como los correspondientes a la recta en disolvente.

A la vista de los resultados de la **Tabla V.5.2.** se puede decir que efectivamente, tal y como se demostró en el *apartado V.3.* el efecto general de la matriz es de supresión en todos los pesticidas analizados. El efecto supresor fue calculado en función de la recta en matriz media ($n=5$) de las pendientes de todos los estados de maduración ensayados con respecto a la pendiente de la recta en disolvente.

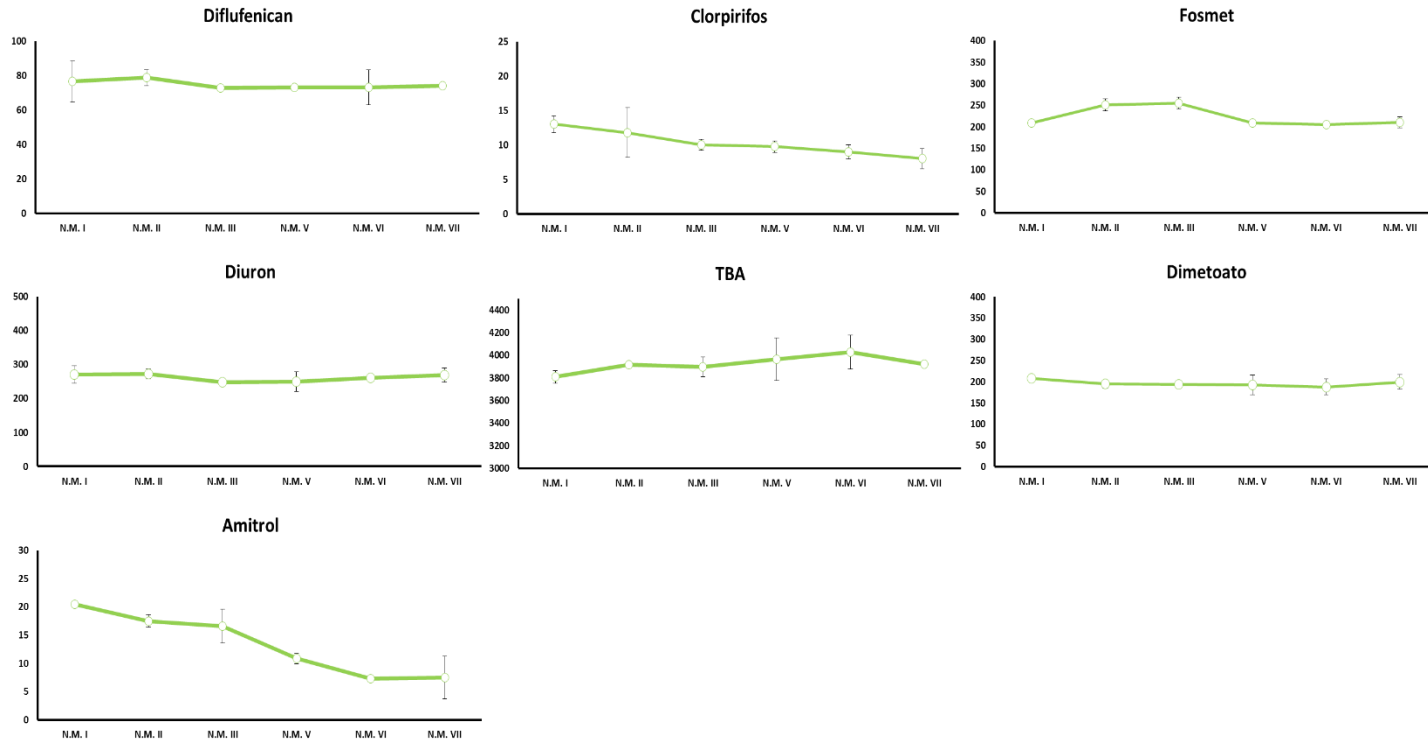


Figura V.5.1. Evolución de las pendientes de las rectas de calibrado en matriz procedente del método de *ASEL* en función del estado de maduración para cada uno de los pesticidas en estudio.

Tabla V.5.2. Parámetros de regresión lineal para las rectas de calibrado ($n=3$) para cada uno de los pesticidas en estudio en función del nivel de maduración ensayado. *N.M.* Nivel de Maduración.

	<i>Diflufenican</i>					<i>Clorpirifos</i>				
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>
Disolvente	82,72	146,96	0,9978	11,99	14%	16,81	-148,70	0,9971	3,59	13%
N.M. I	76,57	-18,93	0,9993	4,46	6%	13,03	-15,24	0,9950	1,25	9%
N.M. II	78,71	236,60	0,9990	0,06	0%	11,81	-40,96	0,9994	3,61	26%
N.M. III	72,82	155,04	0,9990	0,41	1%	10,04	-12,72	0,9986	0,82	8%
N.M. V	73,24	244,52	0,9980	10,19	14%	9,77	-79,74	0,9936	0,84	8%
N.M. VI	73,25	446,52	0,9944	0,34	0%	9,01	-75,08	0,9946	1,26	13%
N.M. VII	74,11	171,43	0,9995	0,66	1%	8,01	-14,08	0,9950	1,44	17%
Media	74,78					10,28				
SD	2,35	Efecto Matriz de Supresión del 10%				1,84	Efecto Matriz de Supresión del 39%			
RSDs (%)	3,14					17,93				
	<i>Fosmet</i>					<i>Diuron</i>				
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>
Disolvente	315,92	728,32	0,9991	4,81	2%	330,57	156,90	0,9997	10,02	3%
N.M. I	208,33	-232,22	0,9999	1,10	1%	270,59	173,80	0,9996	25,90	10%
N.M. II	251,01	2085,50	0,9996	14,21	6%	272,55	613,50	0,9998	14,44	5%
N.M. III	255,17	228,37	0,9998	13,78	5%	247,63	64,11	0,9994	2,76	1%
N.M. V	208,53	583,02	0,9987	6,67	3%	249,42	109,60	0,9993	29,10	12%
N.M. VI	204,74	517,28	0,9996	7,25	4%	260,78	144,00	0,9997	8,11	3%
N.M. VII	209,98	261,53	0,9992	12,59	6%	268,75	76,42	0,9997	20,97	8%
Media	222,96					276,95				
SD	23,44	Efecto Matriz de Supresión del 29%				20,25	Efecto Matriz de Supresión del 21%			
RSDs (%)	10,51					4,17				

Capítulo V.5. Influencia del estado de maduración.

	<i>Terbutilazina</i>					<i>Dimetoato</i>				
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>
Disolvente	4283,60	28678	0,9968	3,87	0%	302,26	544,51	0,9997	7,36	2%
N.M. I	3807,70	25951	0,9974	57,98	2%	207,42	-49,67	0,9999	2,65	1%
N.M. II	3914,30	29124	0,9964	11,80	0%	194,62	-387,92	0,9995	9,98	5%
N.M. III	3896,40	31060	0,9964	86,69	2%	193,28	-283,32	0,9991	5,73	3%
N.M. V	3963,50	24466	0,9971	189,57	5%	192,28	-437,77	0,9986	22,90	12%
N.M. VI	4028,80	25673	0,9972	150,97	4%	187,73	-391,52	0,9995	18,17	10%
N.M. VII	3919,00	27877	0,9971	19,52	0%	199,03	-400,55	0,9996	17,61	9%
Media	3921,62					195,73				
SD	73,37	Efecto Matriz de				6,79	Efecto Matriz de			
RSDs (%)	1,87	Supresión del 8%				3,47	Supresión del 35%			

	<i>Amitrol</i>				
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>
Disolvente	34,81	-300,76	0,9990	5,26	15%
N.M. I	20,43	2264,00	0,9978	0,26	1%
N.M. II	17,47	3088,50	0,9871	1,12	6%
N.M. III	16,58	2543,00	0,9957	2,99	18%
N.M. V	10,83	1282,60	0,9981	0,89	8%
N.M. VI	7,27	1781,60	0,9942	0,41	6%
N.M. VII	7,44	1793,30	0,9969	3,77	51%
Media	13,34				
SD	5,58	Efecto Matriz de			
RSDs (%)	41,85	Supresión del 62%			

Por otra parte, observando la tendencia de las pendientes mostradas en la **Figura V.5.1.** se puede apreciar que en la mayoría de los pesticidas estudiados no existe una influencia apreciable por *efecto del nivel de maduración* exceptuando el caso del Clorpirifos y Amitrol, en el que sí se observa una disminución.

En el caso del *Diflufenican* se aprecia claramente que todas las pendientes en matriz no presentan diferencias significativas entre ellas ($RSDs = 3\%$) por lo que su determinación no estaría influenciada por el estado de maduración. Lo mismo ocurrió al evaluar *Fosmet*, Diuron, *TBA* y *Dimetoato*, cuyos valores de $RSDs$ fueron menores al 10% en todos los casos (10%, 4%, 2% y 3%, respectivamente) por lo que se puede afirmar que la determinación de estos pesticidas no está influenciada por el estado de maduración.

En el caso del *Clorpirifos* y el *Amitrol* se observa una reducción del valor de la pendiente conforme aumenta el estado de maduración de las aceitunas, generando valores de $RSD > 10\%$ en ambos casos. Se puede concluir que la determinación de estos pesticidas está influenciada por el estado de maduración, particularmente en el caso del Amitrol.

V.5.3.1.2. Influencia en la cantidad de matriz extraída.

Para evaluar la cantidad de matriz co-extraída en función del estado de maduración se procedió a determinar el residuo seco contenido en cada nivel. En la **Figura V.5.2.** se muestran los valores medios en peso seco encontrados en los extractos para cada nivel de maduración estudiado.

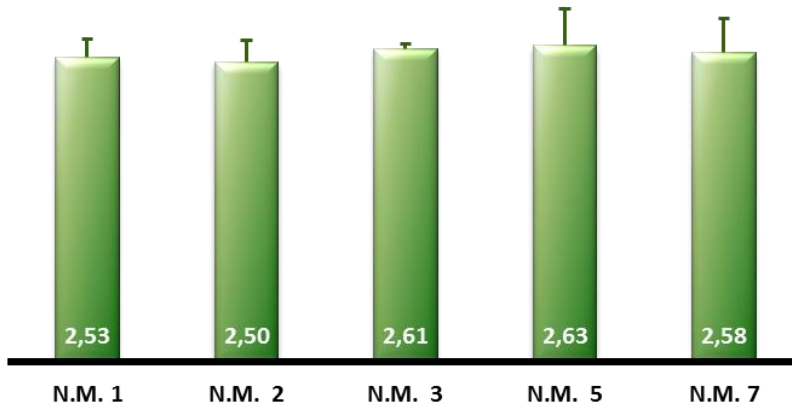


Figura V.5.2. Cantidad de matriz extraída por el método ASEL (expresada como mg de matriz por cada gramo de aceituna) en cada uno de los estados de maduración estudiados ($n=3$). (N.M: o nivel de maduración).

Los resultados muestran que en todos los casos se encontró una cantidad muy reducida de matriz. Además, se observó que no existían diferencias significativas entre las medias, por lo que en principio se puede concluir que el método ASEL extrae una cantidad de matriz que es independiente del estado de maduración de las aceitunas.

V.5.3.2. Resultados para el método QuEChERS.

V.5.3.2.1. Influencia en la pendiente.

Para estudiar cómo afecta el estado de maduración se evaluó la tendencia de las pendientes de las rectas calibradas en matriz de cada uno de los estados de maduración ensayados.

En la **Figura V.5.2.** se muestran las gráficas correspondientes a la *Evolución de las pendientes medias en cada nivel de maduración* para cada uno de los pesticidas en estudio, mientras que en la en la **Tabla V.5.3.** se muestran los valores de pendiente, ordenada en el origen y R^2 correspondientes a cada una de ellas, así como los correspondientes a la recta en disolvente.

A la vista de los resultados mostrados en la **Tabla V.5.3.** se puede observar que el efecto general de la matriz es de supresión en todos los pesticidas analizados, a excepción de la TBA donde dicho efecto no fue significativo.

El efecto supresor fue calculado en función de la recta en matriz media de todos los estados de maduración ensayados. Dicho efecto matriz de supresión fue mucho más elevado que en el caso del tratamiento ASEL, poniendo de manifiesto que a pesar de haberse realizado sin etapa de purificación, el método ASEL da lugar a un efecto matriz notablemente inferior al del método QuEChERS con aplicación de dicha etapa.

Respecto al estudio de la tendencia de las pendientes se puede concluir que en la mayoría de los pesticidas estudiados no existe influencia por *efecto del nivel de maduración* en su determinación ya que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las rectas calibradas en matriz QuEChERS para cada nivel estudiado (*RSDs* < 15%), exceptuando el caso concreto del *Clorpirifos* que, tal y como ocurría en el estudio de las pendientes de rectas calibradas en matriz procedente de extractos ASEL, mostró un *RSDs* > 20%.

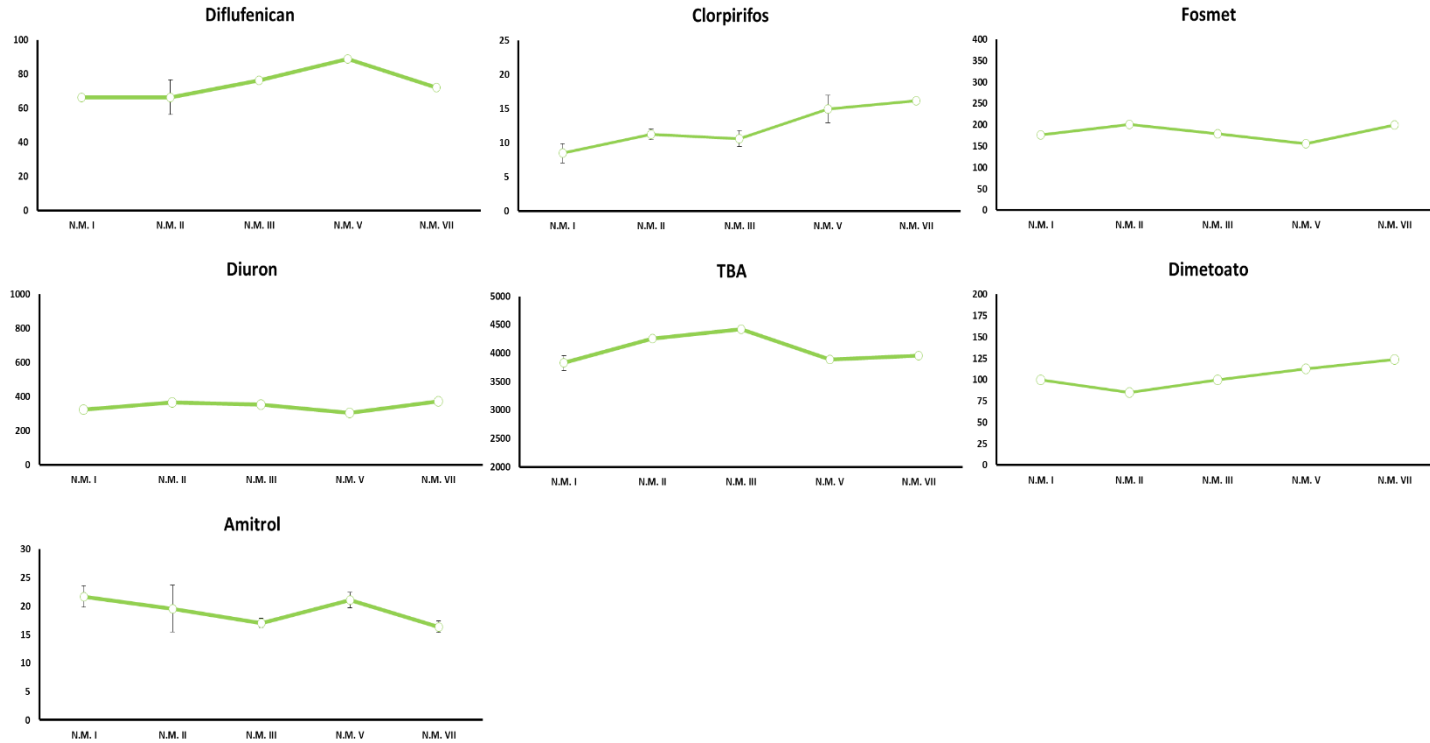


Figura V.5.3. Evolución del valor de las pendientes de las rectas de calibrado en matriz procedente del método de *QuEChERS* en función del nivel de maduración (N.M.) de las aceitunas para cada uno de los pesticidas en estudio.

Tabla V.5.3. Relación de pendientes medias (n=3) a partir del tratamiento de extracción *QuEChERS* para cada uno de los pesticidas en estudio en función del nivel de maduración (N.M.) ensayado.

	<i>Diflufenican</i>					<i>Clorpirifos</i>				
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>
Disolvente	91,68	115,19	0,9997	11,94	13%	24,01	-46,92	0,9998	7,38	31%
N.M. I	66,13	589,54	0,9972	0,72	1%	8,51	11,05	0,9951	1,41	17%
N.M. II	66,38	1397,00	0,9941	10,17	15%	11,26	-56,83	0,9978	0,78	7%
N.M. III	76,27	405,30	0,9997	0,10	0%	10,62	-79,65	0,9812	1,17	11%
N.M. V	88,75	580,94	0,9994	1,50	2%	14,97	-98,17	0,9947	2,01	13%
N.M. VII	72,01	216,27	0,9985	0,90	1%	16,20	-71,45	0,9956	0,38	2%
Media	73,91					12,31				
SD	9,31	Efecto Matriz de				3,19	Efecto Matriz de			
RSDs (%)	13%	Supresión del 19%				26%	Supresión del 49%			
	<i>Fosmet</i>					<i>Diuron</i>				
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>
Disolvente	320,51	2813,80	0,9977	19,88	6%	303,15	3236,30	0,9988	76	25%
N.M. I	176,36	1157,80	0,9987	3,8	2%	325,22	3366,30	0,9996	9,99	3%
N.M. II	200,3	-135,31	0,9995	2,15	1%	366,03	2950,20	0,9997	9,11	2%
N.M. III	178,51	-83,19	0,9997	1,87	1%	353,95	360,41	0,9999	21,92	6%
N.M. V	155,59	320,49	0,9987	1,97	1%	303,46	263,01	0,9999	13,53	4%
N.M. VII	199,53	-114,12	0,9999	1,82	1%	371,03	-289,92	0,9998	8,39	2%
Media	182,06					563,94				
SD	18,60	Efecto Matriz de				64,67	Efecto Matriz de			
RSDs (%)	10%	Supresión del 43%				11%	Supresión del -13%			

Capítulo V.5. Influencia del estado de maduración.

	Terbutilazina					Dimetoato				
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>
Disolvente	3973,60	31017	0,9974	162,43	4%	312,26	544,51	0,9997	0,23	0%
N.M. I	3826,40	85507	0,9962	130,39	3%	99,62	418,11	0,9999	2,15	2%
N.M. II	4256,20	52965	0,9977	25,03	1%	85,28	-231,02	0,9995	1,44	2%
N.M. III	4418,00	31267	0,9989	18,81	0%	99,58	-315,61	0,9995	0,98	1%
N.M. V	3888,20	19358	0,9996	7,57	0%	112,49	-330,22	0,9991	0,65	1%
N.M. VII	3958,50	18996	0,9994	56,64	1%	123,84	-228,31	0,9995	0,27	0%
Media	4069,46					104,16				
SD	255,24	No existe				14,62	Efecto Matriz de			
RSDs (%)	6%	Efecto Matriz				14%	Supresión del 67%			
	Amitrol									
	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R²</i>	<i>sd</i>	<i>RSD</i>					
Disolvente	28,05	-356,82	0,9909	3,7	13%					
N.M. I	21,68	6644,20	0,9785	1,89	9%					
N.M. II	19,54	5421,50	0,9907	4,11	21%					
N.M. III	17,05	5314,70	0,9444	0,81	5%					
N.M. V	21,09	4713,70	0,9896	1,38	7%					
N.M. VII	16,38	4791,40	0,9529	1,00	6%					
Media	19,15									
SD	2,37	Efecto Matriz de								
RSDs (%)	12%	Supresión del 32%								

V.5.3.2.2. Influencia en la cantidad de matriz extraída.

Para evaluar la cantidad de matriz co-extraída en función del estado de maduración se procedió a determinar el residuo seco contenido en cada nivel. Los resultados medios se muestran a continuación en la **Figura V.5.4.**

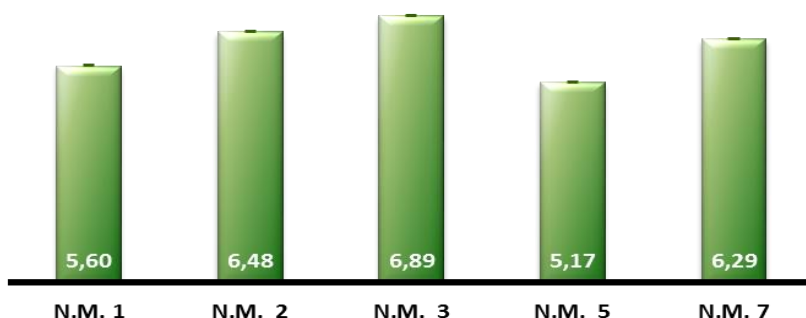


Figura V.5.4. Cantidad de matriz media extraída por el método *QuEChERS* (expresada como mg de matriz por cada gramo de pasta de aceituna) para cada uno de los niveles de maduración (N.M.) estudiados. Los valores mostrados corresponden a la media de un total de tres extracciones por estado de maduración.

En base a los resultados medios encontrados se puede concluir que la cantidad de matriz extraída sería independiente del estado de maduración de las aceitunas, ya que no se observa ninguna tendencia entre las cantidades medias extraídas en cada estado de maduración. Así, la cantidad de matriz en los extractos procedentes del método *QuEChERS* es de $6,09 \pm 0,69$ mg de matriz /1 g pasta de aceitunas ($RSDs = 11\%$), lo que significa más de un 60% de matriz que en los extractos procedentes del método ASEL.

V.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ASEL DE ACUERDO A LAS RECOMENDACIONES PUBLICADAS POR LA UE A TRAVÉS DE LA GUÍA *SANCO/12571/2013*.

V.6.1. Introducción: definición, método de ensayo y niveles de concentración.

Tras la optimización de las condiciones del método *ASEL* se procedió a la validación del método de acuerdo a las recomendaciones publicadas por la *UE* a través de la guía *SANCO*²⁹⁴/*12571/2013*.

Los *métodos* utilizados en los laboratorios de análisis químico han de ser evaluados y sometidos a diversas pruebas para atestiguar que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados. Asimismo, todos los métodos nuevos que se introducen en un laboratorio deben ser contrastados, y además, aquéllos procedimientos validados que son modificados deben ser verificados.

La *validación* o *verificación* de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. Así, los métodos de validación se pueden clasificar en *métodos cualitativos* y *cuantitativos*. En los *métodos cualitativos* se incluyen los parámetros cuyo cumplimiento es necesario para la validación: Especificidad/selectividad, Límite de detección (*LOD*) y de cuantificación (*LOQ*), Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad) y Estabilidad. Para aquéllos en los que sea necesario

establecer un nivel de concentración definido para reflejar resultados (*métodos cuantitativos*), deben determinarse los parámetros adicionales siguientes: Linealidad, Exactitud, Recuperación e Incertidumbre de la medición y Robustez del método.

El objetivo propuesto en el presente capítulo fue validar el método ASEL en base a las recomendaciones de la guía SANCO determinando los parámetros citados anteriormente y fue aplicable a la determinación de los pesticidas Diflufenican, Amitrol, Clorpirifos, Dimetoato, TBA, Fosmet, Oxifluorfen y Diuron en el rango de concentraciones máxicas comprendidas entre 0-300 mg·kg⁻¹. Los diferentes niveles de concentración de los analitos de interés fueron preparados usando patrones de grado analítico en cinco días diferentes que fueron utilizados para formar las correspondientes curvas de calibrado.

Una vez obtenidas las curvas de calibrado, se procedió al cálculo de los parámetros necesarios para la validación del método.

V.6.2. Selectividad y especificidad.

La capacidad de un método para determinar un analito sin interferencias tales como impurezas, productos de degradación u otras sustancias presentes en la muestra se relaciona con el término de *selectividad*.

La *selectividad* es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma

inequívoca en presencia de otras sustancias químicas endógenas o exógenas, que pueden estar presentes en la muestra. La presencia de interferencias puede dar lugar a distintos efectos en la determinación tales como imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos) o distorsionar la respuesta del analito, afectando así a la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de calibrado.

Frecuentemente, el término *especificidad* se utiliza como sinónimo del anterior aunque debería reservarse a aquéllos procedimientos que empleen instrumentación específica donde la respuesta obtenida solo se pueda referir a una única entidad química. Dado que la identificación de los analitos vendrá dada a través de su detección por espectrometría de masas, se podrán aplicar en la presente validación los dos términos indistintamente.

La *selectividad* del método ASEL fue evaluada a través de la determinación de la posible presencia de picos interferentes en muestras “blanco”, es decir, extractos procedentes de aceitunas libres de pesticidas. La ausencia de picos interferentes, tanto en los cromatogramas como en los espectros de masas a los tiempos de retención específicos para cada uno de los pesticidas en dichos extractos confirmó la selectividad del método, y por lo tanto no fueron encontradas señales correspondientes a falsos positivos en las muestras, tal y como se puede observar en la **Figura V.6.1.**

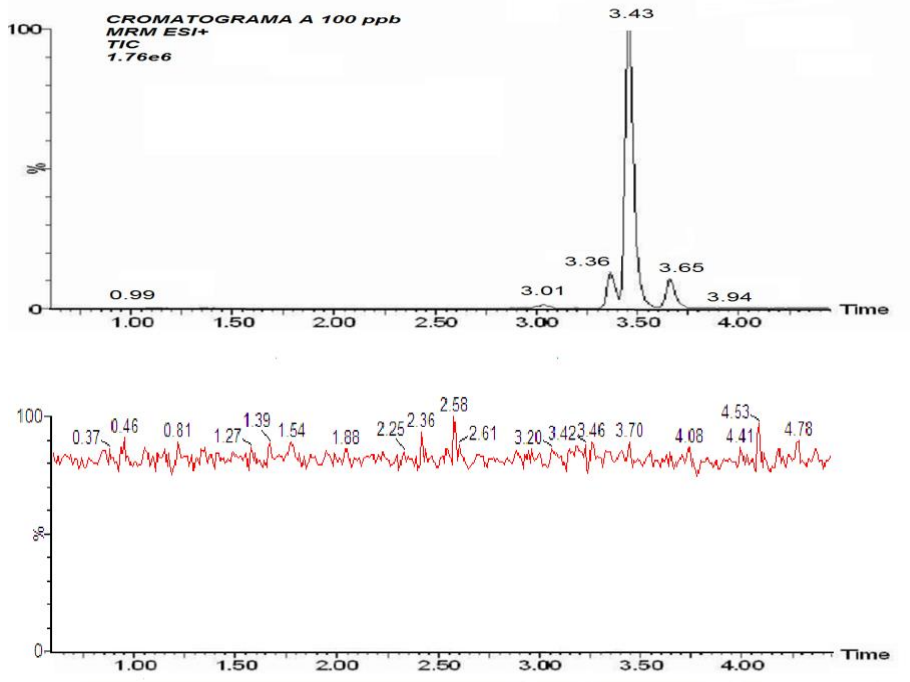


Figura V.6.1. Cromatogramas correspondientes al conjunto de pesticidas en estudio a partir de un extracto ASEL fortificado a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (negro) frente a un blanco de aceitunas (rojo).

V.6.3. Confirmación de la identidad de pico.

Por lo que respecta a la *confirmación de la identidad de pico*, ésta fue determinada con el cálculo del denominado de dos parámetros, el “ion ratio” o relación de iones (q/Q) de cada uno de los pesticidas en disolvente y en matriz y el tiempo de retención (t_R) según establece la Directiva 2002/657/EC de la Guía SANCO/12571/2013.

V.6.3.1. Confirmación de la identidad de pico: Cálculo del Ion Ratio.

El Ion Ratio se define como la relación de iones (q/Q). Dicha relación se calcula a partir de la identificación de dos de las transiciones m/z correspondientes a los dos iones de mayor intensidad de cada uno de los pesticidas de interés, tras perfundir una disolución del patrón puro en el espectrómetro de masas. De esta manera, fueron seleccionadas dos transiciones m/z , por un lado, la de mayor sensibilidad (Q) cuya área sirvió con fines de cuantificación y un segundo ión, de menor intensidad, que fue seleccionado con fines confirmatorios (q).

Para establecer el Ion Ratio de cada uno de los pesticidas, se calculó la relación entre las transiciones q y Q que fueron medidas tras perfundir una disolución patrón de pesticidas en disolvente a $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Una vez establecido el Ion Ratio en disolvente, se procedió a comprobar si dicho parámetro se mantenía al trabajar con patrones de pesticidas en matriz. El estudio del Ion Ratio en matriz fue realizado a partir de patrones de pesticidas a tres niveles de 20, 100 y $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Los resultados pueden verse en la **Tabla V.6.1**.

Tabla V.6.1. Evaluación del *ion ratio* para los pesticidas en disolvente y en matriz a partir del extracto fortificado a tres niveles de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). La tolerancia máxima permitida fue de $\pm 30\%$.

PESTICIDAS	Ion Ratio disolvente	Tolerancia		Nivel I (20ppb)	Nivel II (100ppb)	Nivel III (250ppb)	Ion Ratio Matriz	% Desviación
		+30%	-30%					
DIFLUFENICAN	0,82	1,06	0,57	0,73	0,78	0,81	0,77	6%
CLORPIRIFOS	1,61	2,09	1,12	1,60	1,66	1,70	1,65	7%
FOSMET	0,05	0,06	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	12%
DIURON	0,04	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	16%
TBA	0,17	0,22	0,12	0,17	0,17	0,17	0,17	8%
DIMETOATO	0,70	0,91	0,49	0,71	0,65	0,72	0,69	-16%
AMITROL	1,96	2,55	1,37	1,96	1,94	1,93	1,94	-27%
OXIFLUORFEN	0,06	0,08	0,04	0,06	0,06	0,07	0,06	6%

Según la guía SANCO/12571/2013 el límite de tolerancia máxima relativa para el Ion Ratio en métodos cromatográficos se establece $\pm 30\%$, por lo que la identidad de pico para cada uno de los pesticidas fue solo confirmada si dicho parámetro se mantenía dentro de este intervalo.

A la vista de los resultados mostrados en la citada Tabla se puede comprobar que la desviación en el Ion Ratio se mantiene dentro de los márgenes admitidos para todos los analitos y en los diferentes niveles de fortificación. Cabe mencionar que en el caso del Amitrol el porcentaje de desviación de su Ion Ratio es elevado, cercano al límite admitido por la Guía.

Finalmente, dado que no existían diferencias entre los niveles de concentración estudiados, se calculó la medida del Ion Ratio en matriz, como la media de los valores calculados en cada nivel y se estimó el valor

de desviación que existe para el Ion Ratio en disolvente y en matriz. De este modo, se estableció dicho valor medio como criterio dentro del método de masas, con una tolerancia de $\pm 30\%$, como primer parámetro a tener en cuenta a la hora de confirmar la identidad de pico.

V.6.3.2. Confirmación de la identidad de pico: Cálculo del Tiempo de Retención.

El segundo parámetro para confirmar la identidad de pico fue el tiempo de retención o t_R . Para ello, se fijaron los t_R a partir de patrones de pesticidas en disolvente y en matriz en diferentes días y concentraciones y se calculó para cada uno de ellos, la media, la desviación típica y un intervalo de confianza específico cuya significancia estadística se estimó en un 95%. De este modo, siempre que se inyectase una muestra además de confirmarse el Ion Ratio, debía mantenerse el t_R especificado durante el ensayo de validación. Los resultados pueden verse en la **Tabla V.6.2**.

Tabla V.6.2. Tiempos de retención medios e intervalos de confianza para una distribución normal al 95% para cada uno de los pesticidas en estudio. Datos expresados en min.

PESTICIDAS	t_R Disolvente		t_R Matriz	
	Media (%RSDs)	IC ₉₅	Media (%RSDs)	IC ₉₅
Diflufenican	3,64 (0,4)	3,64 \pm 0,006	3,65 (0,2)	3,64 \pm 0,005
Clorpirifos	3,95 (0,1)	3,95 \pm 0,003	3,94 (0,1)	3,94 \pm 0,009
Fosmet	3,36 (0,0)	3,36 \pm 0,016	3,36 (0,2)	3,36 \pm 0,011
Diuron	3,36 (0,0)	3,36 \pm 0,006	3,36 (0,4)	3,36 \pm 0,011
TBA	3,42 (0,1)	3,42 \pm 0,000	3,43 (0,1)	3,43 \pm 0,004
Dimetoato	3,02 (0,5)	3,02 \pm 0,012	3,01 (1,0)	3,01 \pm 0,023
Amitrol	1,01 (0,9)	1,01 \pm 0,007	0,99 (2,2)	0,99 \pm 0,017
Oxifluorfen	3,76 (0,2)	3,76 \pm 0,007	3,78 (0,3)	3,78 \pm 0,009

V.6.4. Sensibilidad: límites de detección y cuantificación.

La *Sensibilidad* es la cantidad mínima de analito que una determinada técnica es capaz de detectar o a partir de la cual puede generar una señal, o bien la capacidad de un método analítico para registrar ligeras variaciones de concentración.

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la pendiente de la curva de calibración. Algunas veces se expresa informando de la razón entre el valor de señal obtenida a una concentración dada de estándar. Para expresar la sensibilidad se suelen utilizar dos parámetros principalmente: Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

El *límite de detección (LOD, del inglés Limit of Detection)* se define como la cantidad o concentración mínima de analito que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Así, el *LOD* sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente.

El *límite de cuantificación (LOQ, del inglés Limit of Quantification)* se define como la cantidad o concentración mínima de analito que puede ser cuantificada con fiabilidad por un método analítico determinado.

El *LOQ* es por lo tanto un término cuantitativo mientras que el *LOD* es solo cualitativo, encontrándose en ambos términos un rango de

concentraciones en que si bien no se puede cuantificar al analito en estudio con razonable certeza, si pueda detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.

V.6.4.1. Metodología seguida en la determinación del LOD y el LOQ.

En métodos cromatográficos existen varios métodos para calcular estos parámetros siendo el más difundido el valor de la media de los blancos más tres veces su desviación típica en el caso del LOD, mientras que serán 10 veces el valor de la desviación en el caso del LOQ.

De este modo, inicialmente se realizó un estudio de blancos en días/curvas diferentes con el objetivo de determinar la ausencia de señal al t_R de cada uno de los pesticidas en matriz y cuyas áreas de pico fueron utilizadas para fijar los valores de LOD y LOQ del método analítico.

Con los resultados de áreas de pico obtenidos para los blancos, se determinaron la media y la desviación típica en unidades de concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) interpolando en la curva correspondiente. Con estos datos se procedió a calcular los LOD y LOQ siguiendo las fórmulas:

$$\text{LOD} = \bar{x} + 3 \text{ sd} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \bar{x} + 10 \text{ sd} \quad (2)$$

siendo \bar{x} la media de la concentración del blanco y sd , la desviación típica de un total de “n” medidas en matriz.

Dado que no existía señal apreciable al t_R de los pesticidas en la matriz, se procedió a establecer estos valores a partir de otro criterio diferente.

Dicho criterio se basa en calcular el valor de LOD de un analito evaluando la cantidad mínima de éste que es posible detectar con una intensidad de señal que sea igual a 3 veces el valor de S/N (*Signal to Noise*), mientras que el LOQ será calculado cuando la intensidad de la señal sea igual a 10 veces la relación S/N . Este método se aplica comúnmente a los métodos de análisis que muestran el ruido de línea de base.

De este modo, para realizar éste cálculo se prepararon una serie de muestras con cantidades decrecientes de cada uno de los pesticidas, tomando como valor inicial el del *LMR del* pesticida. La concentración de analito se fue disminuyendo al mismo tiempo que lo hacía la intensidad de señal hasta llegar a los valores de intensidad de $S/N=3$ y 10 equivalentes al LOD y LOQ, respectivamente.

De cada una de las concentraciones que fueron ensayadas se tomaron 6 lecturas y se prosiguió a seguir decreciendo la concentración, estableciéndose como límite de precisión adicional al criterio S/N que el *RSD* de las lecturas fuera $< 10\%$, dicho valores pueden verse reflejados en la **Tabla V.6.3**.

Así, aunque en la mayoría de los casos se alcanzaba un valor de $S/N = 3$ a un valor de concentración inferior, sólo se seleccionó como LOD, el valor de concentración cuyo *RSD* fuese inferior al 10%. Por ejemplo, en el caso

del Diflufenican cuyo valor de intensidad de $S/N = 3$ fue de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, su valor de RSD fue muy superior al 10%, por lo que hubo que subir el LOD hasta $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en el que la RSD fue inferior al 10%. Esta condición fue aplicada a todos los pesticidas, tanto para evaluar el *LOD* como el *LOQ*.

Tabla V.6.3. Evaluación del LOD y LOQ para los pesticidas a partir del extracto fortificado a diferentes niveles de concentración. En la tabla se muestran los valores para las últimas 4 concentraciones ensayadas para cada uno de los pesticidas. Los valores destacados en verde corresponden a los valores hallados para el *LOD*, mientras que en color rojo se muestran los valores correspondientes al *LOQ*.

PESTICIDAS	($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	INTENSIDAD MEDIA (n=6)	RSDs	PESTICIDAS	($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	INTENSIDAD MEDIA (n=6)	RSD
DIFLUFENICAN	1,00	51,58	2%	TERBUTILAZINA	0,06	110,01	2%
	0,80	15,63	3%		0,03	36,67	8%
	0,60	8,66	14%		0,01	21,67	19%
	0,40	3,66	56%		0,001	23,13	22%
CLORPIRIFOS	8,00	12,56	1%	DIMETOATO	0,80	17,75	4%
	4,00	5,22	7%		0,60	7,77	7%
	3,00	3,8	9%		0,40	5,38	7%
	2,00	2,84	16%		0,20	3,13	23%
FOSMET	0,80	24,98	3%	AMITROL	30,00	50,04	10%
	0,30	7,57	9%		10,00	14,86	10%
	0,20	3,60	29%		8,00	5,04	17%
	0,10	2,33	20%		6,00	2,47	110%
DIURON	0,80	13,58	8%	OXIFLUORFEN	250,00	26,3	8%
	0,30	7,62	11%		200,00	18,74	9%
	0,20	4,02	10%		100,00	4,98	10%
	0,10	2,17	14%		50,00	2,46	36%

Según el método experimental Eurachem³⁰¹ las muestras utilizadas para el cálculo del LOD y LOQ deben ser las correspondientes a las concentraciones de analito más cercanas o por debajo del LOD que es esperado ya que, para técnicas como la cromatografía que se basan en la

detección de un pico por encima del ruido, las muestras con niveles de concentración cerca o por encima del LOD son obligatorias.

De este modo, una vez comprobados los LOD y LOQ a través del método S/N, se procedió a corroborar su cálculo a través del método Eurachem. Para ello, una vez alcanzado el nivel más bajo de concentración cuya intensidad de lugar a un grado aceptable de incertidumbre (LOD encontrado por el método anterior), se inyectó dicha concentración “10” veces en repetibilidad de modo que se establezca el LOD y el LOQ aplicando las fórmulas (1) y (2) anteriormente indicadas. En la **Tabla V.6.4.** se muestran los valores de los LOD y LOQ encontrados aplicando dicho método.

Tabla V.6.4. Evaluación del *LOD* y *LOQ* ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) para cada uno de los pesticidas siguiendo el método *Eurachem* ³⁰¹.

PESTICIDAS	Conc. Ensayada	Área	sd	RSD	Pendiente	LOD	LOQ
Diflufenican	0,80	314,38	3,38	6%	72,04	0,14	0,47
Clorpirifos	2,00	56,97	2,07	9%	10,28	0,53	1,76
Fosmet	0,30	68,80	1,69	9%	217,81	0,02	0,08
Diuron	0,20	247,14	4,89	10%	256,07	0,06	0,19
Terbutilazina	0,30	27769,54	38,09	3%	3949,44	0,03	0,10
Dimetoato	0,60	519,41	9,07	8%	205,89	0,13	0,44
Amitrol	40,00	1262,47	51,76	17%	7,63	20,35	67,84
Oxifluorfen	100,00	49,08	7,78	20%	0,39	60,00	200,00

V.6.5. Linealidad, Rango Lineal y Calibración.

La *Linealidad* es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la

muestra dentro de un rango establecido. Se puede decir que la *Linealidad* de un método define su aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito, mientras que el *Rango lineal* corresponde al rango de concentraciones de analito para las cuales el método brinda resultados proporcionales a la concentración.

Para asegurar el rango de linealidad se estudiaron los factores de respuesta a diferentes niveles de concentración en tres días no consecutivos de validación.

Por su parte, el *Rango de Trabajo* es el intervalo de concentración en el que puede obtenerse una exactitud y precisión adecuadas al objetivo del método. Éste parámetro indica el alcance del método, de forma que deben de comprobarse los criterios de exactitud y precisión en al menos tres puntos: límite inferior, punto medio del rango y límite superior. Así, el intervalo de un procedimiento analítico o rango es el intervalo de concentraciones en que se ha demostrado que el método validado tiene un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad.

La normativa de la guía *SANCO* recomienda que para establecer la *linealidad* se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones para establecer una correcta calibración, siendo esta calibración aceptable cuando la interpolación entre dos niveles o la diferencia entre los niveles no sea mayor de un factor de 4.

La curva de calibración (que puede o no ser lineal) no debe ser forzada a pasar por el origen. El ajuste de la función de calibración debe ser trazado y la inspección puede ser visual y/o mediante el cálculo de los residuales, evitando confiar en los coeficientes de correlación.

Si dichos residuales se desvían más de $\pm 20\%$ ($\pm 10\%$ en los casos en que se aborda el *LMR*) de la curva de calibración en la región correspondiente, una calibración alternativa debe ser utilizada. Para ello se recomienda el uso de la regresión lineal ponderada ($1/X$).

V.6.5.1. Determinación de la Linealidad, Rango Lineal y Calibración.

Como ya se ha puesto de manifiesto en el *Apartado V.3.*, existe un apreciable efecto matriz en el conjunto de los analitos objeto de estudio, por lo que para evaluar la linealidad del nuevo método propuesto se han estudiado tanto las rectas de calibración en disolvente como en matriz.

La *linealidad* del método *ASEL* fue evaluada a partir de las curvas de calibración en matriz con patrones de los pesticidas objeto de estudio. Para el ensayo, se estudiaron un diferentes curvas de calibrado con un total de 7 niveles de concentración en el intervalo de 10 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, realizadas tanto en matriz como en disolvente.

La relación entre los datos experimentales de área y concentración se ajustaron según regresión lineal por mínimos cuadrados incluyendo la ordenada en el origen, es decir:

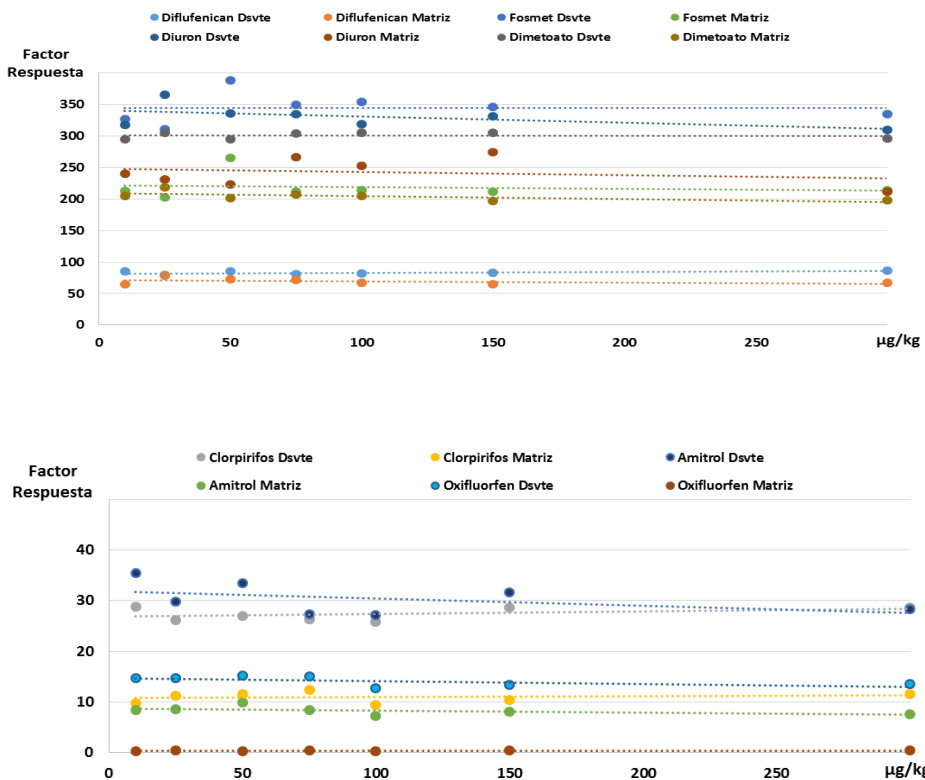
$$y = (a \cdot x) + b$$

Donde, “y” es el área del pico cromatográfico, “a” es la pendiente de la recta de regresión, “x” es la concentración del pesticida correspondiente expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y “b” es la ordenada en el origen de la recta de regresión. El estudio de las curvas de calibrado fue realizado de la siguiente forma:

- Se elaboraron al menos tres curvas de calibrado independientes por cada día del estudio de validación. Cada uno de los niveles de concentración fueron inyectados por triplicado. Los puntos de calibración se ensayaron de manera aleatoria, sin orden establecido, para evitar efecto memoria del equipo.
- Las curvas se ensayaron en 5 días diferentes (reproducibilidad).
- Se realizaron las regresiones pertinentes en cada caso con los datos de concentración y unidades de área de cada curva con el fin de determinar los límites de confianza de la pendiente.
- Se determinaron los siguientes parámetros de cada una de las curvas de calibrado:
 - ✓ coeficiente de determinación (r^2),
 - ✓ pendiente (a),
 - ✓ ordenada en el origen (b),
 - ✓ error típico de los residuales (Sy/x),
 - ✓ coeficiente de variación de los factores de respuesta (FR_{RSD}).

Para el estudio del rango y la linealidad se determinaron los factores de respuesta f (y/x) como el Área dividido por la concentración y se calcularon la media, la desviación típica y el porcentaje de variación.

Con estos datos, se construyó una gráfica de factores respuesta frente a concentración (**Figura V.6.1.**) para valorar el rango de concentraciones donde la respuesta es lineal y es aplicable la ecuación de regresión. En una calibración lineal ideal los factores de respuestas deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.



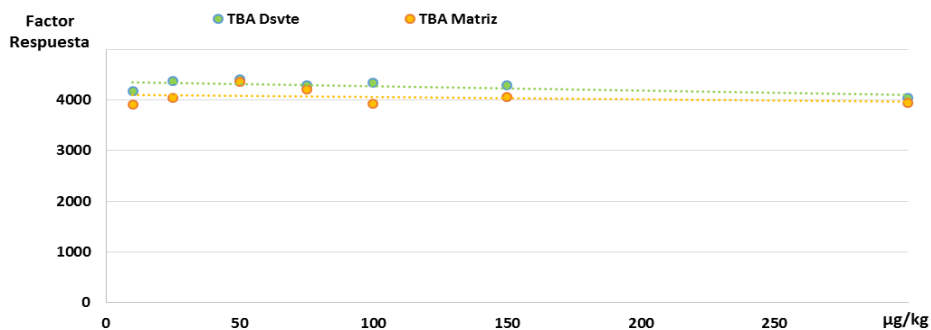


Figura V.6.2. Factores Respuesta vs. Concentración para cada uno de los pesticidas en estudio a las distintas concentraciones ensayadas, tanto en rectas de calibrado en disolvente como en matriz.

Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre los factores de respuesta dentro de cada uno de los días de la validación ni tampoco entre ellos, siendo los RSD (%) en todos los casos inferiores al 10% tanto en rectas en disolvente como en matriz, por lo que se estableció que el rango estudiado era lineal 10 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Dichos valores pueden verse resumidos en la **Tabla V.6.5**.

Tabla V.6.5. Evaluación de los Factores Respuesta (FR = y/x) para cada uno de los pesticidas en rectas en disolvente y en matriz. Los valores mostrados corresponden a la media encontrada en los cinco días de ensayo de validación.

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Diflufenican		Clorpirifos		Fosmet		Diuron	
	FR disolvente	FR matriz	FR disolvente	FR matriz	FR disolvente	FR matriz	FR disolvente	FR matriz
10	85,57	65,06	28,76	9,78	326,62	212,56	318,26	240,64
25	78,13	79,78	26,19	11,31	311,27	202,96	365,69	231,29
50	84,93	72,34	26,97	11,57	388,67	264,88	335,70	222,78
75	80,60	71,95	26,29	12,37	349,12	211,40	334,60	266,57
100	81,66	66,70	25,81	9,49	354,76	213,49	318,43	252,33
150	83,00	64,32	28,64	10,46	346,08	212,33	331,96	274,62
300	86,48	67,45	28,58	11,57	334,53	214,45	310,30	211,85
Media	82,91	69,66	27,32	10,94	344,44	218,87	330,71	242,87
sd	2,99	5,45	1,30	1,05	24,51	20,64	18,20	22,96
cv	4%	8%	5%	10%	7%	9%	6%	9%

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Terbutilazina		Dimetoato		Amitrol		Oxifluorfen	
	FR disolvente	FR matriz	FR disolvente	FR matriz	FR disolvente	FR matriz	FR disolvente	FR matriz
10	4178,22	3916,28	295,24	205,35	35,47	8,44	14,78	0,36
25	4378,43	4038,41	304,68	218,63	29,75	8,61	14,75	0,41
50	4398,53	4361,59	295,30	201,66	33,44	9,95	15,18	0,34
75	4298,63	4203,30	304,22	206,84	27,25	8,37	15,03	0,49
100	4346,72	3918,03	304,70	204,46	27,20	7,34	12,75	0,37
150	4284,58	4066,10	305,73	196,62	31,62	8,14	13,36	0,42
300	4039,07	3943,40	296,46	197,67	28,34	7,60	13,51	0,47
Media	4274,88	4063,87	300,90	204,46	30,44	8,35	14,19	0,41
sd	127,00	166,48	4,94	7,33	3,20	0,84	0,96	0,06
cv	3%	4%	2%	4%	10%	10%	7%	14%

Además de los factores respuesta, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de aceptación de las curvas de calibrado:

- las rectas deben tener un $\text{FR}_{\text{RSD}} \leq$ al 10%,
- los r^2 de las curvas de calibración deben ser $\geq 0,99$,
- el Ion Ratio se debe mantener dentro de los límites de tolerancia especificados en la **Tabla V.6.1.**,
- y que los t_R deben estar dentro de los intervalos establecidos en la **Tabla V.6.2.**

Los resultados obtenidos para las curvas de calibración para cada uno de los pesticidas en estudio pueden verse resumidos en la **Tabla V.6.6**.

Tabla V.6.6. Parámetros de calibración para rectas realizadas en matriz y en disolvente. Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas en días distintos. El Efecto Matriz fue expresado como la relación de pendientes correspondiente a la recta de calibrado en matriz frente a la de disolvente.

PESTICIDAS	Parámetros Recta en Disolvente			Parámetros Recta Matriz ASEL			Efecto Matriz
	Pendiente	Ordenada	(r^2)	Pendiente	Ordenada	(r^2)	
DIFLUFENICAN	84,20 (16)	143,57	0,9988	72,04 (12)	257,84	0,9984	14%
CLORPIRIFOS	16,81 (9)	-148,70	0,9971	10,28 (17)	36,42	0,9933	39%
FOMET	333,92 (12)	1220,50	0,9980	217,81 (19)	-47,12	0,9995	35%
DIURON	321,87 (9)	-475,97	0,9986	256,07 (10)	196,09	0,9986	20%
TERBUTILAZINA	4212,60 (12)	15432,00	0,9985	3949,44 (12)	26604,00	0,9959	6%
DIMETOATO	302,26 (2)	544,51	0,9997	205,89 (12)	-396,72	0,9996	32%
AMITROL	30,69 (14)	208,62	0,9954	7,63 (21)	958,19	0,9991	55%
OXIFLUORFEN	14,32 (6)	17,91	0,9980	0,3889 (54)	10,249	0,9587	97%

A la vista de los resultados se puede observar que las curvas presentaron coeficientes de determinación (r^2) mayores a 0.99 y por lo tanto, mostraron una buena linealidad. Únicamente el Oxifluorfen presentó una baja linealidad en el rango estudiado, con unos valores de $r^2 < 0.99$ para la recta matriz. Como ya se comentó anteriormente, la pendiente de la recta de calibrado en matriz se reduce prácticamente a cero en el caso del Oxifluorfen, lo que limita en la práctica la aplicabilidad del método para la determinación de este analito.

No obstante, tal y como recomienda la guía SANCO, la calibración no puede basarse únicamente en los r^2 con valor 0.99, por lo que además se

tuvieron en cuenta que los residuales no se desviasen más de $\pm 20\%$. Esto fue comprobado para cada uno de los pesticidas estudiados introduciendo un límite del $\pm 20\%$ en el método de masas.

V.6.6. Precisión: Repetibilidad y Reproducibilidad.

La *Precisión* es el parámetro que expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones especificadas.

La variabilidad de los resultados obtenidos se debe al hecho de que nunca se puede repetir de forma exacta un mismo análisis, ya que es imposible controlar determinados parámetros. La variabilidad aumenta al aumentar las fuentes de error, los más habituales son los propios analistas, instrumentos, reactivos, el tiempo y el entorno.

La *precisión* puede medirse a tres niveles: repetibilidad (del sistema y del método), la precisión intermedia y reproducibilidad. Para conocer dichas mediciones suelen evaluarse la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (coeficiente de variación o *RSD*).

V.6.6.1. Repetibilidad: Determinación y Resultados.

La *repetibilidad* es la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el

mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo.

Para ello, se evaluó la diferencia entre los resultados de ensayos, obtenidos por el mismo analista y con el mismo equipo, en condiciones de operación constantes y para idéntico material de ensayo. La dispersión entre resultados, expresada como coeficiente de variación, no debería exceder un valor del 20%.

$$CV = \frac{S}{X} \cdot 100$$

La *Repetibilidad del equipo* se midió a partir de la estimación de la variabilidad de lectura del equipo de análisis, realizándose un total de 11 inyecciones en el UPLC-MS/MS a partir de una muestra fortificada a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en disolvente. Los resultados mostraron un *RSD* < 20% en todos los pesticidas, por lo que el equipo era adecuado para el análisis.

La *Repetibilidad del método* se estimó como la variabilidad del equipo de análisis + la variabilidad de la etapa de preparación. Para realizar este ensayo, fueron realizadas 6 extracciones a partir de muestras fortificadas a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en matriz. Posteriormente, se realizó una única lectura en el UPLC-MS/MS con cada uno de los extractos obtenidos. Finalmente, se calcularon los *RSD* de las lecturas para la repetibilidad del método.

Según las recomendaciones de la guía SANCO, dicho coeficiente de variación debe ser $\leq 20\%$. Los resultados medios de *repetibilidad del método* pueden verse en la **Tabla V.6.7**.

Tabla V.6.7. Repetibilidad del método ASEL en muestras fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Pesticidas	MEDIA \pm sd	RSDs	Pesticidas	MEDIA \pm sd	RSDs
Diflufenican	90,37 \pm 5,63	6%	Terbutilazina	101,00 \pm 3,03	3%
Clorpirifos	81,41 \pm 4,88	6%	Dimetoato	73,46 \pm 5,14	7%
Fosmet	99,03 \pm 10,89	11%	Amitrol	17,42 \pm 3,56	20%
Diuron	80,72 \pm 2,42	3%	Oxifluorfen	< LOQ	< LOQ

A la vista de los resultados, se puede concluir que el método ASEL tuvo una buena repetibilidad, mostrando valores de *RSD* menores al 20%, tal y como establece la guía SANCO. El Oxifluorfen no pudo cuantificarse a las concentraciones estudiadas, ya que eran inferiores a su *LOQ*.

V.6.6.2. Reproducibilidad: Determinación y Resultados.

La *reproducibilidad* interlaboratorios es la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mesurando, con diferentes operadores, diferentes equipos de medida, en diferentes laboratorio, etc.

Para la validación del método ASEL se calculó la reproducibilidad intralaboratorio analizando la *precisión Inter-día* que consiste en analizar la misma muestra a lo largo de varios días. Concretamente, se estimó la precisión realizando el mismo procedimiento durante 5 días consecutivos y estimando el coeficiente de variación de las concentraciones obtenidas.

Este coeficiente no ha de superar un valor del 20 %. Los resultados de las determinaciones durante 5 días consecutivos pueden verse en la **Tabla V.6.8.**

Tabla V.6.8. Precisión Inter-día. Los valores corresponden a la concentración media ($n=5$) obtenida tras la inyección de un único extracto ASEL procedente de muestras fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Media	sd	RSD
Diflufenican	97,51	89,98	92,86	86,48	87,77	90,92	4,41	5%
Clorpirifos	90,91	80,37	69,64	91,68	80,08	82,54	9,09	11%
Fosmet	100,35	102,14	98,72	108,32	95,54	101,01	4,75	5%
Diuron	85,46	79,97	92,99	75,33	83,65	83,48	6,58	8%
Terbutilazina	97,15	94,13	103,03	101,84	102,4	99,71	3,89	4%
Dimetoato	76,43	72,81	75,93	83,14	74,88	76,64	3,89	5%
Amitrol	14,9	18,65	15,22	11,31	15,42	15,10	2,60	17%
Oxifluorfen	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

V.6.7. Exactitud.

La *Exactitud* es el parámetro que expresa el grado de concordancia entre el valor hallado y el valor que se acepta como valor verdadero convencional o como valor de referencia aceptado. Se relaciona con la existencia de un error sistemático que haga que los resultados se desvíen de forma constante respecto a los valores esperados, es decir, que la media experimental difiera del valor verdadero.

El término “exactitud”, esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios (precisión) y un componente común de error sistemático o sesgo

(veracidad). Por lo tanto, en un método de ensayo el término “exactitud” se refiere a una combinación de veracidad y precisión.

La veracidad determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado y suele ser determinada por sesgo o recuperación.

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material control, material ensayo de aptitud, etc. Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido en repetibilidad. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$Exactitud = \frac{\text{Valor de Referencia} - \text{Valor Obtenido}}{\text{Valor de Referencia}} \times 100$$

La *Exactitud* en términos de recuperación debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico y se recomienda un mínimo de 5 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado. Según la guía SANCO, dichas recuperaciones deben encontrarse en el rango de 70-120% con unos valores de *RSDs* < 20%. Excepcionalmente, cuando la recuperación sea baja pero constante (es decir, que demuestre una buena precisión), una recuperación media inferior al 70% puede ser aceptable.

V.6.7.1. Exactitud: Determinación y Resultados.

Para calcular la *Exactitud* del método ASEL en términos de veracidad o sesgo fue necesario determinar por un lado los porcentajes de recuperación en muestras de aceitunas fortificadas y por otro, los porcentajes de recuperación correspondientes al valor real de la disolución de fortificación. Ambos tipos de porcentajes fueron evaluados a tres niveles de concentración (20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Para conocer el valor de referencia o verdadero de las muestras fortificadas se partió de las mismas disoluciones de concentración para la fortificación que fueron usadas para fortificar en disolución. La relación entre ambos tipos mostrará la exactitud en términos de error sistemático de la determinación.

V.6.7.1.1. Estimación del Valor de Referencia o Verdadero.

Para el cálculo del valor de referencia se realizó un análisis de los porcentajes de recuperación a tres niveles de concentración a partir de aceitunas libres de pesticidas que fueron adicionadas directamente en disolución a las concentraciones de fortificación empleadas en el estudio de recuperación.

Para ello, un total de 15 muestras de 30 g de aceitunas fueron depositadas en 15 frascos y tratadas con tres tipos de disoluciones mezcla de pesticidas a 20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en ACN, de modo que el mismo extractante fuera el que introdujese los analitos en el extracto. De este modo, los patrones soportarán todo el proceso *ASEL* hasta su

inyección, conociéndose así el valor real de recuperación del procedimiento en matriz y en condiciones de concentración conocidas. Los resultados encontrados para el valor de referencia se muestran en la **Tabla V.6.9**.

Tabla V.6.9. Recuperaciones medias ($n=15$) obtenidas tras la aplicación del método ASEL en muestras de aceitunas que fueron fortificadas a tres niveles de concentración directamente en disolución y porcentaje de error relativo asociado.

PESTICIDAS	250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
	Rec. (RSDs)	% Er	Rec. (RSDs)	% Er	Rec. (RSDs)	% Er
DIFLUFENICAN	92 (10)	8%	95 (7)	5%	99 (25)	1%
CLORPIRIFOS	93 (10)	7%	97 (10)	3%	106 (19)	-6%
FOSMET	104 (4)	-4%	113 (9)	-13%	106 (17)	-6%
DIURON	101 (11)	-1%	103 (15)	-3%	102 (18)	-2%
TERBUTILAZINA	109 (4)	-9%	102 (10)	-2%	93 (16)	7%
DIMETOATO	104 (10)	-4%	107 (12)	-7%	99 (13)	1%
AMITROL	102 (17)	-2%	88 (5)	12%	< LOD	
OXYFLUORFEN	78 (10)	20%	< LOQ		< LOD	

La concordancia entre el valor hallado y el valor real introducido en el ensayo permitió calcular el error sistemático del método. En todos los niveles de concentración ensayados dicho error fue inferior al 15%, demostrando así la *exactitud* del procedimiento, a excepción del Oxifluorfen que sólo fue exacto al nivel de concentración más alto.

Para considerar el procedimiento como exacto en rangos altos es recomendable realizar este tipo de prueba estadística para comprobar

si el porcentaje de recuperación varía en función de la concentración analizada.

La Hipótesis de partida o H_0 seleccionada fue que *existe suficiente evidencia estadística para demostrar una exactitud del método a las tres concentraciones ensayadas*. La significancia estadística fue realizada al 95%. Los resultados se muestran en la **Tabla V.6.10**.

Los resultados confirmaron que existía suficiente evidencia estadística para demostrar la exactitud del método a las 3 concentraciones estudiadas en los 6 pesticidas en estudio, ya que $F < p\text{-valor}$ y por lo tanto, se acepta H_0 . (Se dejaron fuera del análisis de la varianza a los pesticidas Amitrol y Oxifluorfen dado que a la concentración de $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ estaban por debajo de su LOD y LOQ , de modo que no hubo recuperaciones en este grupo de concentración).

Tabla V.6.10. Análisis de la varianza de un factor para seis de los pesticidas en estudio. Los resultados pertenecen a las recuperaciones medias de 5 extractos diferentes realizados durante 5 días consecutivos.

Grupos	Nº Pesticidas	Suma	Promedio	Varianza		
$20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6	605	100,83	24,57		
$100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6	617	102,83	43,37		
$250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6	611	101,83	57,37		
ANOVA	SS	df	MS	F	P-valor	F crítico
Entre grupos	12	2	6	0,14	0,87	3,68
Dentro de los grupos	626,5	15	41,8			
Total	638,5	17				

SS (suma de cuadrados), df (grados de libertad), MS (promedio de los cuadrados), F (estadístico F para los valores tabulados), $P\text{-valor}$ (probabilidad del estadístico), $F\text{ crítico}$ (valor crítico de F).

V.6.7.1.2. *Exactitud del Método ASEL en muestras fortificadas: sesgo y recuperación.*

Una vez obtenida la estimación del valor verdadero, fue evaluada la exactitud a través del estudio del sesgo en términos de error sistemático y de los porcentajes de recuperación en muestras de aceitunas fortificadas en multicapa a tres niveles de concentración de 20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

a) Veracidad o Sesgo

Para evaluar la exactitud en cuanto al estudio de la veracidad o sesgo atendiendo al porcentaje de error sistemático, se estudió el %Er a partir de los resultados encontrados en el análisis de un total de 15 extracciones en muestras fortificadas a una concentración conocida de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Los resultados pueden verse reflejados en la **Tabla V.6.11**.

El error sistemático fue calculado como el porcentaje existente entre la diferencia del valor hallado con respecto al valor de verdadero o de referencia que fue calculado en el apartado anterior, es decir,

$$Er(\%) = \frac{\text{Valor Obtenido} - \text{Valor Referencia}}{\text{Valor de Referencia}} \times 100$$

Tabla V.6.11. Recuperaciones medias (*RSD*) y error sistemático asociado para cada uno de los pesticidas en estudio procedentes de un ensayo ASEL realizado a partir de muestras fortificadas a $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n=15$).

PESTICIDAS	Valor ASEL	Valor Real	% Er
DIFLUFENICAN	94 (7)	92 (10)	-2%
CLORPIRIFOS	77 (9)	93 (10)	18%
FOSMET	97 (8)	104 (4)	7%
DIURON	83 (3)	101 (11)	-18%
TBA	91 (4)	109 (4)	17%
DIMETOATO	76 (7)	104 (10)	27%
AMITROL	11 (8)	102 (17)	89%
OXIFLUORFEN	<i>n.d.</i>	78 (10)	---

Atendiendo a los resultados se puede comprobar que el método tiene un porcentaje de inexactitud asociado al propio procedimiento de extracción, siendo inferior al 20% en la mayoría de los pesticidas en estudio. No obstante, también se puede apreciar un mayor porcentaje de inexactitud en el análisis de pesticidas como Dimetoato ($Er=27\%$), y una clara falta de exactitud en el análisis de pesticidas como el Amitrol o el Oxifluofen a la concentración ensayada.

b) Recuperación

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original, por lo que la recuperación esta intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

Generalmente, deben ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar y calcular la diferencia atendiendo a la siguiente ecuación:

$$R = 100 X \left(\frac{C_f - C_o}{C_a} \right)$$

donde C_f es la concentración de analito observada tras la fortificación, C_o es la concentración de analito en la muestra sin adicionar y C_a es la concentración teórica de fortificación.

Para evaluar la exactitud a partir del estudio de los porcentajes de recuperación se partió de muestras de aceitunas libres de pesticidas fortificadas a tres niveles de concentración. Para cada nivel, fueron realizadas un total de 5 extracciones.

La exactitud vendrá determinada como la concordancia entre el valor encontrado y el valor teórico de referencia. Los resultados se muestran en la **Tabla V.6.12**.

Tabla V.6.12. Recuperaciones medias (RSD) para cada uno de los pesticidas en estudio procedentes de un ensayo a 3 niveles de concentración ($n=15$).

PESTICIDAS	Rec 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Rec 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Rec 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Media (RSD)
DIFLUFENICAN	92 (14)	90 (18)	94 (7)	92 (2)
CLORPIRIFOS	83 (20)	73 (16)	77 (9)	78 (6)
FOSMET	104 (18)	96 (20)	97 (8)	99 (4)
DIURON	79 (20)	88 (17)	93 (3)	87 (8)
TBA	99 (21)	104 (13)	91 (4)	98 (7)
DIMETOATO	73 (20)	72 (11)	76 (7)	74 (3)
AMITROL	< LOQ	11 (8)	14 (8)	13 (17)
OXIFLUORFEN	< LOQ	< LOQ	5 (20)	---

A la vista de los resultados, se observa que el método ASEL puede ser considerado exacto para 6 de los 8 pesticidas en estudio de acuerdo

a las recomendaciones de la guía SANCO en las que se especifica que las recuperaciones para considerar un método como exacto deberían estar entre el 70-120% y con los $RSDs \leq 20\%$. Para aseverarlo, procedimos a efectuar un ANOVA para evaluar la exactitud global del método ASEL (Amitrol y el Oxifluorfen no fueron incluidos en el ANOVA). Los resultados se muestran en la **Tabla V.6.13**.

Tabla V.6.13. Análisis de la varianza de un factor para seis de los pesticidas en estudio. Los resultados pertenecen a las recuperaciones medias de 5 ensayos en días distintos empleando muestras a tres niveles de fortificación.

Grupos	Nº Pesticidas	Suma	Promedio	Varianza		
20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6	514,99	85,83	97,93		
100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6	515,49	85,92	158,65		
250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6	520,12	86,69	99,13		
ANOVA	SS	df	MS	F	P-valor	F crítico
Entre grupos	2,67	2	1,34	0,01	0,99	3,68
Dentro de los grupos	1778,59	15	118,57			
Total	1781,26	17				

SS (suma de cuadrados), df (grados de libertad), MS (promedio de los cuadrados), F (estadístico F para los valores tabulados), P-valor (probabilidad del estadístico), F crítico (valor crítico de F).

Los resultados estadísticos del ANOVA mostraron que la hipótesis se acepta, es decir, $F < p\text{-valor}$ y por lo tanto se puede decir que el método ASEL es exacto en el rango estudiado de 20-250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para 6 de los 8 pesticidas en estudio, y por lo tanto, se comprueba que existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el método ASEL es exacto dentro del rango establecido.

V.7. EFECTO DEL LAVADO PREVIO DEL FRUTO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOS PESTICIDAS APLICANDO EL MÉTODO ASEL.

V.7.1. Introduccion: antecedentes.

La influencia de la introducción de una etapa de lavado del fruto en el contenido en pesticidas en las aceitunas ya fue estudiada anteriormente en los trabajos realizados por *M. Guardia-Rubio et al.* entre los años 2004-2007. En dichos trabajos fueron realizadas varias investigaciones sobre la influencia de la introducción de una etapa de lavado sobre el comportamiento de algunos plaguicidas presentes en las aceitunas y la posible incorporación de éstos al aceite de oliva ^{167-169,171,172,302}.

Se concluyó que una etapa de lavado “*temprana*” podría ser eficaz en la eliminación de los residuos de herbicidas presentes en las aceitunas a consecuencia del contacto de éstas con el suelo contaminado como sucede cuando las aceitunas han caído y son recogidas de la tierra por medio de cepillos o equipos de aspiración. Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo desde la contaminación es más difícil eliminar determinados plaguicidas presentes en la aceituna debido a su retención en las ceras cuticulares ¹⁷¹.

De este modo, según estos estudios un proceso de lavado sólo sería efectivo eliminando aquellos residuos presentes en las aceitunas como consecuencia del contacto de los plaguicidas durante un breve periodo de tiempo. No obstante, también ha sido demostrado que el lavado puede

eliminar eficientemente la contaminación superficial con herbicidas en las aceitunas procedentes del suelo, como Diuron o TBA., aunque no se observa tal disminución en otros pesticidas como el Endosulfan. Finalmente, *M. Guardia-Rubio et al.*, concluyeron que existe una influencia decisiva del método de recogida de la aceituna en la concentración de residuos de herbicidas ¹⁷².

En virtud de los expuestos resultados previos, nuestro propósito se centró en el estudio de la influencia de una etapa de lavado previa a la aplicación del método ASEL sobre la carga total de pesticidas que portan las aceitunas de forma superficial como consecuencia de prácticas agronómicas inadecuadas o una recolección poco cuidadosa.

Para dar respuesta a ello fueron analizadas dos tipos de aceitunas. Por un lado, fueron analizadas aceitunas libres de pesticidas que fueron directamente recogidas del árbol, y por el otro, muestras procedentes del suelo. Cada una de las muestras fue sometida a un proceso de extracción usando el método ASEL con o sin introducción de etapa de lavado previo y los extractos resultantes fueron analizados por UPLC-MS/MS. Además, la influencia de la etapa de lavado sobre la cantidad de matriz extraída por el método también fue objeto de estudio.

V.7.2. Metodología empleada.

A la hora de estudiar la incorporación de una etapa de lavado en el método ASEL, se requiere que este lavado sea realizado de la forma más

reproducibile posible, así las muestras más sucias fueron analizadas con y sin proceso de lavado, pero teniendo en cuenta el uso de un volumen de lavado conocido.

Para el ensayo, además de aceitunas procedentes del árbol, fueron seleccionadas un total de 15 muestras de *suelo* procedentes de la región jiennense recogidas durante la campaña 2010-2011.

La metodología utilizada para llevar a cabo este estudio fue simple, realizando únicamente dos lavados con 30 mL de agua destilada sobre muestras de 30 g de aceitunas. El lavado efectuado fue manual utilizando vasos de precipitados que fueron agitados en cada uno de los dos lavados durante 20 s. A continuación, el agua de los vasos fue eliminada por decantación y el proceso fue repetido.

Las muestras lavadas fueron secadas y depositadas sobre papel absorbente hasta la total evaporación del agua superficial adherida a la superficie de la aceituna (aproximadamente 2h).

Finalmente, todas las muestras fueron sometidas a extracción por medio del método ASEL y cada extracto obtenido fue filtrado por 0,2 μm y analizado por UPLC-MS/MS. Todas las muestras fueron extraídas por triplicado e interpoladas en su correspondiente recta calibrada en matriz que sufrió el mismo procedimiento que las muestras. Un esquema del proceso puede verse en la **Figura V.7.1**.

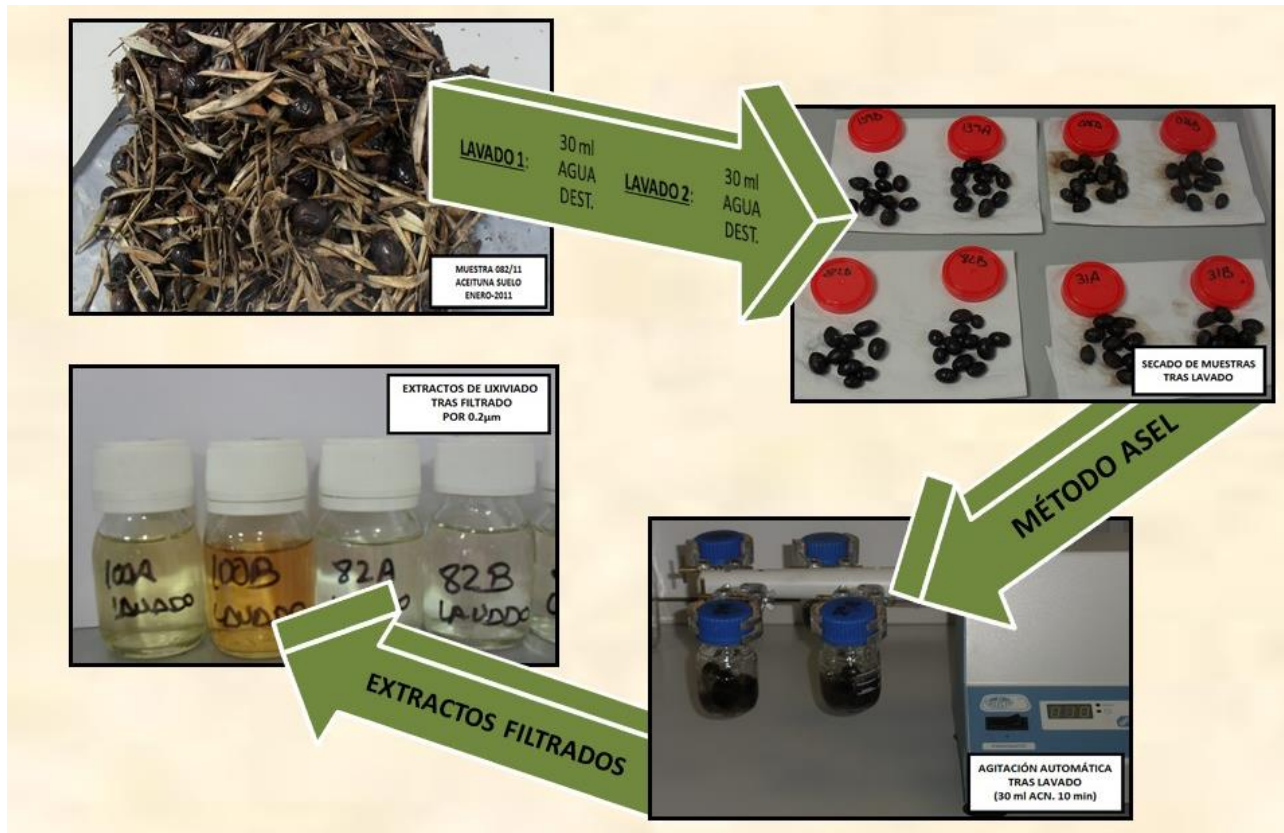


Figura V.7.1. Esquema del procedimiento de las muestras desde su recepción, lavado y filtrado previo a su inyección por UPLC o GC-MS.

V.7.3. Estudio de la cantidad de matriz eliminada por el lavado.

La cantidad de matriz extraída por el método ASEL fue estudiada en apartados anteriores. Así, en aceitunas de la *var. Picual* la cantidad media fue de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para extractos sin etapas de lavado previo o de purificación.

Para comprobar la disminución de matriz por la introducción del lavado se realizó un estudio de la cantidad de matriz en los extractos antes y después del proceso de lavado a partir de *muestras de vuelo* que habían sido previamente fortificadas. Sin embargo, el análisis gravimétrico de la cantidad de matriz extraída en muestras lavadas y no lavadas no mostró diferencias significativas.

El mismo procedimiento fue empleado para conocer el efecto del lavado en muestras de aceituna procedente del *suelo*. El proceso fue repetido un total de tres veces en cada una de las 15 muestras sometidas a estudio, tanto antes como después de la realización del lavado. Los resultados medios pueden verse en la **Tabla V.7.1**.

El análisis de los extractos en muestras de aceitunas de suelo con o sin la introducción de una etapa de lavado mostró un descenso de la cantidad de matriz extraída en gran parte de las muestras estudiadas. No obstante, este descenso no fue homogéneo ya que en muestras con mayor cantidad de suciedad adherida y enmohecidas, este descenso fue mayor (M4 y M12) mientras que en muestras tales como M6, M8 o M10 que prácticamente

estaban desprovistas de suciedad y simplemente portaban hojas, este descenso no fue perceptible.

Finalmente, cabe concluir que en principio la etapa de lavado previo sería adecuada para disminuir la cantidad de matriz presente en el extracto final, especialmente en aceitunas procedentes del suelo, donde es necesario estudiar además si el lavado influiría en la determinación de los pesticidas. En el caso de aceitunas de árbol no se observa una reducción apreciable en la cantidad de matriz extraída tras el lavado del fruto.

Tabla V.7.1. Reducción de la cantidad de matriz (mg de extracto seco por gramo de aceituna) extraída por el método ASEL en aceitunas del suelo al introducir una etapa de lavado.

Muestra	ASPECTO	REDUCCIÓN POR LAVADO	Muestra	ASPECTO	REDUCCIÓN POR LAVADO
M1	FANGO	13%	M09	TIERRA, MOHO	8%
M2	TIERRA, HOJAS	29%	M10	HOJAS	32%
M3	FANGO	8%	M11	LODO, HOJAS	20%
M4	FANGO, MOHO	62%	M12	MOHO, HOJAS	81%
M5	HOJAS, MOHO	7%	M13	HOJAS, PIEDRAS	13%
M6	HOJAS	10%	M14	TIERRA, PIEDRAS	15%
M7	HOJAS	0%	M15	HOJAS	18%
M8	LODO, HOJAS	24%			

V.7.4. Influencia del Lavado del Fruto sobre el Efecto Matriz.

En el *Apartado V.3.*, fue estudiado el Efecto Matriz en la cuantificación de los extractos del método ASEL en el que se concluía que el Efecto Matriz varía en función de la naturaleza del pesticida, por lo que era necesaria una

calibración en matriz para que el método fuese válido. En este apartado, se estudia la influencia del lavado previo del fruto en dicho efecto matriz.

Para ello, fue estudiado el Efecto Matriz antes y después de la etapa de lavado en las rectas de calibrado en matriz comparadas con las correspondientes en disolvente. Las rectas fueron construidas en el rango lineal de 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a partir de extractos procedentes del método ASEL empleando aceitunas de vuelo libres de pesticidas. Los parámetros de regresión lineal pueden verse en la **Tabla V.7.2.** mientras que la tendencia de las pendientes puede verse gráficamente en la **Figura V.7.2.**

Tabla V.7.2. Parámetros analíticos de las rectas de calibrado por UPLC-MS/MS con y sin etapa previa de lavado.

ANÁLISIS UPLC-MS/MS	RECTA EN DISOLVENTE		RECTA EN MATRIZ SIN LAVADO		RECTA EN MATRIZ CON LAVADO		EFECTO DEL LAVADO	
	Pendiente	Ordenada	Pendiente	Ordenada	Pendiente	Ordenada	SIN	CON
							LAV	LAV
DIFLUFENICAN	83,40	125,70	75,03	260,70	72,52	63,79	10%	13%
CLORPIRIFOS	16,18	-132,70	10,12	16,33	9,29	11,21	17%	24%
FOSMET	323,18	1232,70	211,12	-16,47	206,75	200,82	35%	36%
DIURON	350,59	1712,70	271,12	714,01	251,12	214,02	23%	28%
TERBUTILAZINA	4176,50	29851,01	3871,10	15904,02	3851,60	24591,10	7%	8%
DIMETOATO	299,03	482,00	192,73	-491,25	186,52	-163,28	36%	38%
AMITROL	28,08	-275,65	6,82	3541,30	7,55	3820,80	76%	73%
OXIFLUORFEN	20,64	29,31	1,02	17,57	1,06	21,27	95%	95%

A la vista de estos resultados se confirma el notable efecto matriz de supresión que se observa en gran parte de los pesticidas en estudio, tal como se discutió anteriormente.

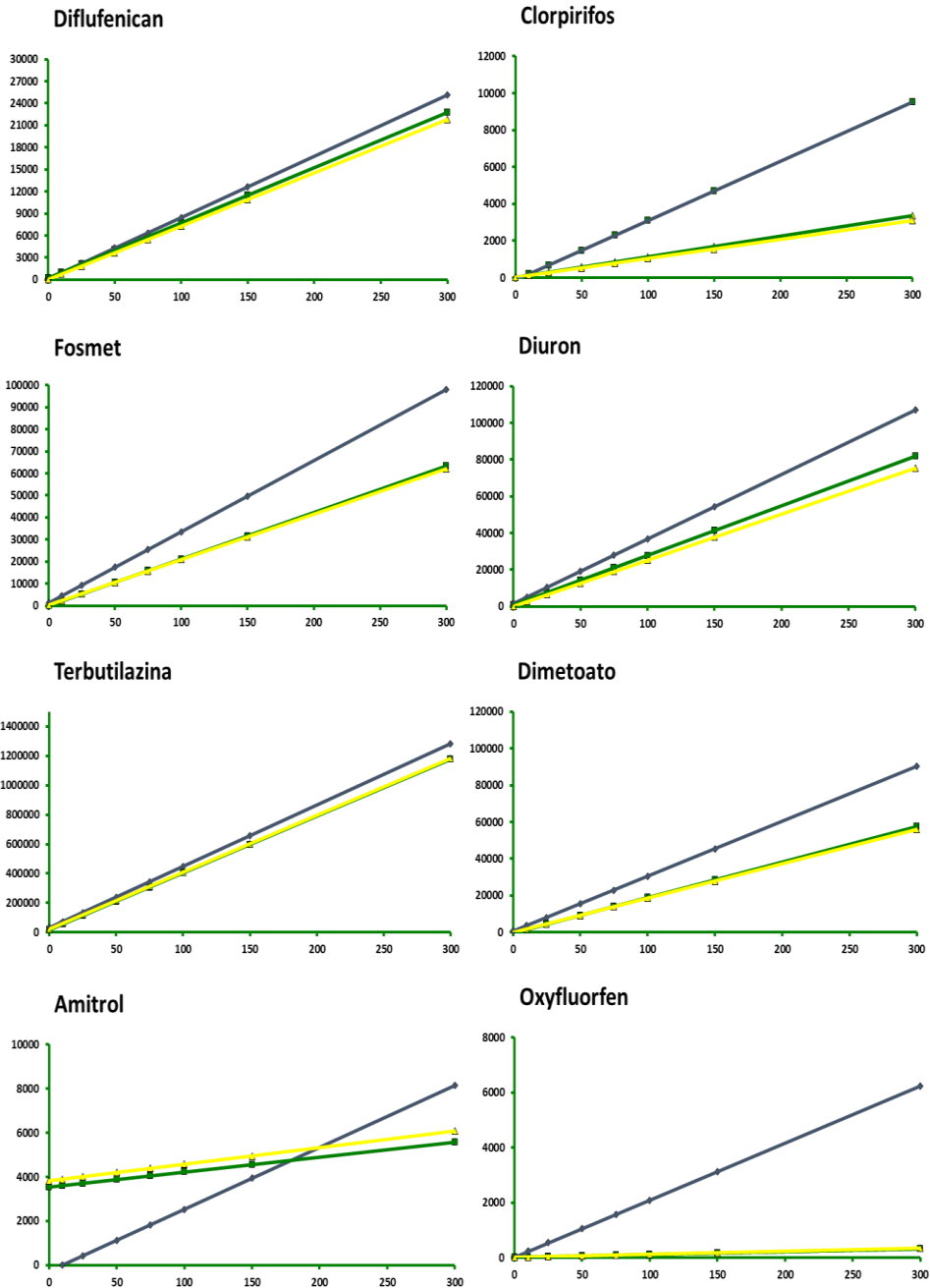


Figura V.7.2. Tendencia de las rectas calibradas en disolvente y en matriz con o sin etapa de lavado, en pesticidas determinados por UPLC-MS/MS.

Por otra parte, la introducción de una etapa previa de lavado de las muestras aumentó ligeramente el efecto supresor de la señal en casi la totalidad de los pesticidas en estudio, aunque el porcentaje de variación del Efecto Matriz en todos los casos fue inferior al 10% con respecto al valor correspondiente sin lavado, concluyéndose así que no existían diferencias significativas entre las pendientes por inclusión o no de una etapa de lavado previo.

Finalmente, se puede afirmar que la etapa de lavado previo con agua de la aceituna no afecta apreciablemente a la sensibilidad del método ASEL ni tampoco reduce la cantidad de matriz extraída por lo que no influye en el resultado final.

V.7.5. Influencia del lavado en muestras de vuelo.

Con el objetivo de comprobar si el lavado con agua pudiera extraer parte de la carga de pesticidas presentes en la superficie del fruto, se efectuó un estudio del extracto procedente del método ASEL empleando como extractante agua, bajo las condiciones habituales del método. Para ello, fueron empleadas muestras de aceitunas libres de pesticidas fortificadas a los niveles de $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Los extractos acuosos resultantes fueron analizados por UPLC-MS/MS por triplicado, empleando para la cuantificación las correspondientes rectas en matriz, en este caso acuosa. Los resultados obtenidos pueden verse resumidos en la **Tabla V.7.3**.

Tabla V.7.3. Recuperaciones medias ($n=5$) en muestras de aceitunas de vuelo fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ que fueron analizadas por UPLC-MS/MS tras el empleo del método ASEL con agua.

PESTICIDAS	Recuperación	% RSD
DIFLUFENICAN	2%	31
CLORPIRIFOS	2%	0,2
FOSMET	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
DIURON	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
TBA	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
DIMETOATO	12%	23
AMITROL	7%	38

A la vista de estos resultados se comprueba que, en las condiciones ensayadas, el agua no extrae los pesticidas presentes en la superficie de las aceitunas en las condiciones ensayadas, y por lo tanto, un lavado previo con agua no reduce la cantidad de pesticidas presentes.

V.7.6. Influencia del lavado en aceitunas de suelo.

Aunque en el apartado anterior se comprobó que la inclusión del lavado no extraería parte de la carga de pesticidas en muestras de vuelo fortificadas previamente, se estudió este mismo efecto pero empleando muestras reales de aceituna de suelo, suministradas por el *Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal* de Jaén. A dichas muestras se les aplicó el método ASEL con y sin etapa de lavado y los extractos obtenidos fueron analizados por UPLC-MS/MS. Los resultados obtenidos pueden verse resumidos en la **Tabla V.7.4.**

Tabla V.7.4. Residuos de pesticidas encontrados en muestras de aceitunas de suelo tras la aplicación del método ASEL con y sin etapa previa de lavado y analizados por UPLC.MS/MS. (Resultados expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

MUESTRA	PESTICIDA	ASEL SIN LAVADO PREVIO		ASEL CON LAVADO PREVIO	
		Media	RSD	Media	RSD
M 1	TBA	17,43	9%	7,57	26%
	Diflufenican	4,36	18%	2,32	20%
M 2	Fosmet	3,32	8%	2,48	15%
M 3	Diflufenican	1,88	16%	0,12*	5%
	TBA	11,61	17%	11,40	11%
M 4	Dimetoato	25,09	12%	1,20	22%
M 5	Fosmet	3,68	9%	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

n.d. Pesticida no detectado en esa muestra por este tratamiento.

A la vista de los resultados, solo algunas de las muestras presentaron trazas de pesticidas y en ninguno de los casos, los valores encontrados superaron los LMR establecidos por la Legislación.

El lavado previo de las muestras tuvo un efecto de disminución del contenido de residuos de pesticidas en las muestras a consecuencia de la gran disminución de suciedad adherida que portaban los frutos, es pues más que considerable que la carga de pesticidas en el tratamiento sin lavado sea consecuencia de residuos de pesticidas que portan otros componentes en las aceitunas de suelo como tierra, hojas, fango, etc. y que no hayan sido adheridos a la superficie de la misma.

En otros casos como en la muestra M3, la cantidad de TBA prácticamente no se vio alterada, probablemente porque si estuviera presente en la superficie del fruto y no en la suciedad adherida al mismo.

V.8. COMPARACIÓN DEL MÉTODO ASEL CON OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN ACEITUNAS.

V.8.1. Introducción: justificación.

En el presente capítulo se procedió a comparar el nuevo método propuesto ASEL frente a otros métodos de determinación de pesticidas en aceitunas actualmente en uso, con el objeto de conocer sus ventajas o inconvenientes.

Entre las características a comparar, además de la eficacia en la determinación de los analitos, se encontraría la cantidad de matriz co-extraída, el consumo de tiempo, disolventes y reactivos, la posibilidad de adaptación a diferentes sistemas de detección, así como la necesidad de incluir etapas de purificación de los extractos.

Los métodos actuales más utilizados en los laboratorios de rutina de determinación *multi-residuo* de pesticidas en aceitunas son el método QuEChERS ²¹⁵, el procedimiento MSPD ^{186,216,234} o diferentes técnicas basadas en la extracción Sólido-Líquido.

Es necesario recordar que los métodos descritos hasta la fecha realizan una determinación de los pesticidas en el fruto entero, no en su superficie, tal y como se propone en el nuevo método descrito en la presente Memoria. Por lo tanto, todos los métodos previamente descritos comienzan con una etapa de molienda del fruto, molienda que no se lleva a cabo al emplear el nuevo método ASEL.

En definitiva, para contrastar la validez del método ASEL nos centramos en el estudio y comparación de dicho método frente a otros dos métodos de determinación de pesticidas como son el método QuEChERS y un procedimiento de *extracción Sólido-Líquido* basado en una extracción con homogenización de la pasta de aceituna con *Ultraturrax* y purificación de los extractos empleando Florisil. Los tres tratamientos fueron aplicados sobre muestras fortificadas a tres niveles de concentración: 20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Además, en cada uno de los procedimientos de extracción estudiados fue comprobada tanto la cantidad como el efecto que produce la matriz sobre la cuantificación de los pesticidas.

Finalmente, cabe señalar que todos los extractos procedentes de la aplicación de los tres métodos fueron analizados por UPLC-MS/MS. El oxifluorfen fue analizado por GC-MS ya que a los niveles de fortificación empleados quedaría por debajo de su LOQ en su análisis por UPLC-MS/MS.

V.8.2. Método de extracción con homogeneizador y purificación con Florisil.

V.8.2.1. Introducción.

El primero de los métodos a comparar con el método ASEL fue un método basado en una extracción sólido-líquido (*S-L*) empleando ACN como extractante sobre la pasta de aceitunas previamente molturadas y homogenizada con la ayuda de un homogeneizador de gran potencia

Ultraturrax T-50 (I.C.T., S.L., España). Este método es una adaptación para el análisis de aceituna del método desarrollado por *Aramendía et al*¹⁸⁴ y era utilizado por el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

V.8.2.2. Metodología.

Para llevar a cabo este método se partió de 1 kg de aceitunas de la *var. Picual* en estado de maduración 3-4 que fueron molidas empleando un molino de martillos de laboratorio MM-100 (MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla, España).

Aproximadamente 4 g de pasta de aceitunas fueron depositados en 4 frascos de extracción y a continuación, 0, 0,16, 0,80 y 2,0 mL de una disolución patrón mezcla de pesticidas en ACN de 0,50 mg·L⁻¹ fueron adicionados en ellos, a fin de obtener una concentración final en los 4 g de 0 (blanco), 20, 100 y 250 µg·kg⁻¹, respectivamente.

A continuación, se procedió a una primera extracción introduciendo 50 mL de ACN y homogenizando la pasta de aceitunas con el ACN con ayuda del dispersador *Ultraturrax*. El extracto fue decantado y filtrado a través de un sistema de filtración a vacío con filtros de 0,45 µm. Este proceso fue repetido en una segunda extracción con 50 mL de ACN. Del extracto obtenido se tomaron 90 mL que fueron evaporados con ayuda de un evaporador a vacío y redissueltos en 20 mL de ACN.

Finalmente, 10 mL del extracto concentrado fueron purificados a través de columnas de 2 g de Florisil, lavados con 10 mL de ACN, enrasados a 25 mL con ACN e inyectados directamente al UPLC-MS/MS. Otros 10 mL del extracto sufrieron el mismo proceso pero fueron nuevamente evaporados hasta sequedad y reconstituidos con mezcla ciclohexano: acetato de etilo (9:1) para poder ser inyectados en GC-MS. La metodología seguida puede verse esquemáticamente en la **Figura V.8.1**.

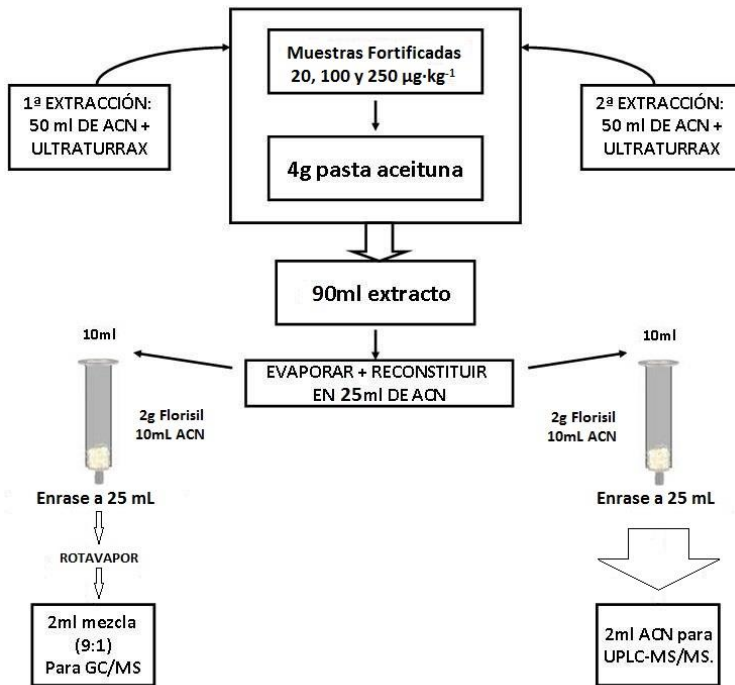


Figura V.8.1. Tratamiento de extracción de pesticidas basado en una extracción S-L con ACN, homogenización con Ultraturrax y purificación de los extractos obtenidos con columnas de Florisil de 2g.

V.8.2.3. Resultados.

V.8.2.3.1. Cantidad de matriz co-extraída.

Para conocer la cantidad de matriz que es co-extraída, antes y después de la etapa de purificación fue realizado un análisis gravimétrico empleando el procedimiento ya descrito con anterioridad. Los resultados medios se muestran en la **Tabla V.8.1**.

A la vista de los resultados, se observa que la etapa de purificación empleando Florisil disminuye la cantidad de matriz de los extractos en casi un 80%, lo cual es muy importante para evitar problemas en los equipos cromatográficos.

Tabla V.8.1. Cantidad media de matriz co-extraída ($n=5$) en la pasta de aceituna a partir de una extracción sólido-líquido con ACN y Florisil.

	Media	RSD
Antes del Florisil (mg/g)	47,4	3%
Tras el Florisil (mg/g)	9,75	8%

V.8.2.3.2. Evaluación del Efecto Matriz.

Para evaluar el efecto matriz del método de extracción con homogeneizador, se comparó la desviación de las pendientes de las rectas de calibrado elaboradas en matriz con las pendientes de las rectas en disolvente, tal como ha sido descrito en apartados anteriores. Los resultados se muestran en la **Tabla V.8.2**.

Tabla V.8.2. Evaluación del *Efecto Matriz* en el método de extracción con Ultraturrax y purificación con Florisil empleando UPLC-MS/MS. El rango lineal fue estudiado entre 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

	RECTA DISOLVENTE		RECTA Tto. PASTA		EFECTO MATRIZ	TIPO
	<i>Pdte</i>	r^2	<i>Pdte</i>	r^2		
DIFLUFENICAN	83,40	0,9926	266,28	0,9998	-219%	AUMENTO
FOSMET	321,44	0,9978	111,75	0,9992	65%	SUPRESION
DIURON	300,16	0,9959	193,32	0,9998	36%	SUPRESION
TBA	4140,30	0,9955	2165,70	0,9931	48%	SUPRESION
DIMETOATO	330,40	0,9944	652,13	0,9992	-97%	AUMENTO
AMITROL	24,11	0,9934	33,09	0,9916	-37%	AUMENTO

Los resultados evidencian la presencia de un efecto matriz, que fue más marcado en pesticidas como el Diflufenican, el Fosmet o el Dimetoato, con más del 65% de desviación de su pendiente con respecto al disolvente.

El tipo de efecto también varió en relación al tipo de pesticida, de modo que el efecto matriz generó un enmascaramiento con *supresión* de la señal analítica en el Fosmet, el Diuron o la TBA, mientras que produjo un gran *aumento* de la señal en Diflufenican, Amitrol o Dimetoato. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, la cuantificación de todas muestras por este tratamiento se realizó a partir del calibrado en matriz.

V.8.2.3.3. Estudio de recuperación en muestras fortificadas.

El método de extracción de los pesticidas a partir de la pasta de aceitunas fue realizado a tres niveles de concentración diferentes

($n=5$). Los extractos fueron analizados tanto por UPLC-MS/MS como por GC-MS. Los resultados medios obtenidos pueden verse resumidos en la **Tabla V.8.3**.

Tabla V.8.3. Recuperaciones medias ($n=5$) obtenidas con el método de extracción con homogenización de la pasta y purificación con Florisil a tres niveles de concentración. Las muestras se analizaron por UPLC-MS/MS y el oxifluorfen por GC-MS (Regresión lineal en Disolvente $y= 109,03x-1880,82$; $r^2=0,9950$ mientras que en Matriz $y=144,97x-658,37$ con un $r^2=0,9994$. Efecto Matriz del 33%).

PESTICIDAS	20 ppb	100 ppb	250 ppb
Diflufenican	90 (2)	100 (3)	99 (15)
Fosmet	83 (1)	87 (1)	89 (5)
Diuron	118 (1)	99 (1)	107 (17)
TBA	97 (6)	100 (2)	92 (7)
Dimetoato	64 (10)	73 (6)	72 (5)
Oxifluorfen	220 (1)	150 (8)	123 (3)

Los resultados obtenidos para las muestras analizadas por UPLC-MS/MS dieron valores cercanos al valor real que se introdujo al fortificar. En el caso del Dimetoato y el Fosmet los resultados fueron algo más bajos de lo esperado, entre el 64-89% de recuperación. Sin embargo, en el caso de la TBA, el Diuron y el Diflufenican, los resultados fueron muy cercanos al 100% a los niveles de fortificación ensayados. En el caso del Amitrol, el efecto matriz no permitió ser detectado correctamente por UPLC-MS/MS a los niveles de fortificación ensayados.

El Dimetoato fue el analito con peores recuperaciones, encontrándose incluso por debajo de este valor para el nivel de fortificación más bajo. El Oxyfluorfen fue introducido en esta determinación, puesto que sus LODs y LOQs en gases fueron menores a los encontrados en líquidos y se pudo cuantificar a los niveles de fortificación ensayados. Sin embargo, sus recuperaciones medias fueron mayores al 120% lo cual puede dar lugar a una sobreestimación del valor real de los pesticidas.

V.8.3. Estudio y cuantificación de la contaminación por residuos de pesticidas en aceitunas a través del método QuEChERS.

V.8.3.1. Introducción.

Desde su introducción en el año 2003 el método de determinación de pesticidas QuEChERS ha generado buenos resultados en un amplio abanico de matrices como frutas, verduras o aguas de consumo.

En el año 2007, Sara Cunha *et al.* publicaban en la revista *J. of Separation Science*²¹⁵ la validez del método QuEChERS en la determinación de los principales pesticidas utilizados en el cultivo del olivo sobre dos tipos de matrices como el aceite y las aceitunas.

Sin embargo, los pesticidas estudiados no son los mismos que se están empleando en esta Memoria y es por ello que la validez de dicho método en la determinación del conjunto de pesticidas estudiados en la presente tesis doctoral tuvo que ser contrastada.

V.8.3.2. Metodología.

Para evaluar correctamente el método QuEChERS fue utilizado el método de fortificación descrito por S. Cunha et al. a partir de una fortificación directa sobre la masa de aceitunas. Este tipo de fortificación fue realizado directamente en tubos tipo Falcon de 50 mL en los que se introdujeron 10 g de aceitunas molturadas libres de pesticidas.

A continuación, fueron adicionados 125 μL de una disolución patrón mezcla de los pesticidas en estudio a concentración de 1,6, 8,0 y 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, con el fin de obtener las concentraciones de 20, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente.

Los pasos seguidos por método QuEChERS utilizado para analizar dichas fortificaciones se resume en los siguientes puntos:

- La *Fase de Extracción* tuvo lugar en tubos de tipo Falcon de 50 mL a los que se les adicionó 10 g de muestra. A continuación, fueron adicionados 4 g de MgSO_4 anhidro y 1 g de NaCl. Inmediatamente antes de la extracción, se adicionaron 10 mL de ACN y se procedió a agitar el tubo 1 min manualmente. Finalmente, los tubos fueron centrifugados 2 min a 4600rpm.
- Para la *Fase de Purificación*, de cada uno de los tubos de extracción se tomaron 5 mL de sobrenadante y posteriormente, fueron depositados en tubos tipo Falcon de 15 mL que previamente contenían una mezcla de adsorbentes en la siguiente relación: 750

mg de MgSO₄ anhidro, 250 mg de PSA, 250 mg de GCB y 250 mg C₁₈. Cada uno de los tubos fue agitado manualmente durante 20 s y a continuación, fue centrifugado a 4600 rpm durante 2 min. De cada uno de los tubos de purificación fueron extraídos unos 3 mL de extracto que fue filtrado a través de 0,2 µm. Finalmente los extractos purificados fueron analizados por UPLC-MS/MS y GC-MS.

V.8.3.3. Resultados.

V.8.3.3.1. Cantidad de matriz co-extraída.

Para conocer la cantidad de matriz que es co-extraída por el método QuEChERS se realizó un análisis gravimétrico a partir de los extractos obtenidos. Por un lado, se estudió cuál era la cantidad de matriz co-extraída por la etapa de extracción, es decir sin *clean up*, y por el otro, se comprobó qué cantidad de matriz elimina la posterior etapa de purificación.

Para ello, en primer lugar se tomaron 5 mL de extracto y se cuantificó la cantidad de matriz gravimétricamente por diferencia de peso tras la evaporación del disolvente. De la misma manera se procedió con los 3 mL de extracto obtenidos tras la purificación. Los resultados medios de ambas etapas del método se muestran en la **Tabla V.8.4.**

Tabla V.8.4. Cantidad de matriz co-extraída por el método QuEChERS. Los valores corresponden a la cantidad media ($n=5$) de matriz en peso seco de extractos pesados antes y después de la etapa de *clean up*.

	Media ($n=5$)	RSD
<i>QuEChERS</i> sin purificar (mg/g)	16,41	4%
<i>QuEChERS</i> + <i>clean up</i> (mg/g)	6,05	15%

A la vista de los resultados, se puede observar que la etapa de purificación disminuye la cantidad de matriz de los extractos en un 80%, tal y como ocurría en el anterior método estudiado.

V.8.3.3.2. Efecto Matriz en el método *QuEChERS*.

Las rectas para la cuantificación de los pesticidas fueron realizadas en matriz. Dicha matriz fue extraída a partir de 5 tubos tipo Falcon de 50 mL que contenían 10 g de aceitunas molidas, a los que se aplicó el mismo procedimiento anteriormente citado para las muestras fortificadas, pero sin la adición de disolución patrón de fortificación.

Las rectas en matriz fueron construidas en el rango lineal de 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, a partir del extracto *QuEChERS* procedente de aceitunas libres de pesticidas y adicionando la cantidad correspondiente de disolución patrón mezcla de pesticidas en ACN ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para obtener los puntos deseados de la recta.

La comparación de las pendientes de las rectas calibradas en disolvente o en matriz permitió conocer el posible *Efecto Matriz* que

pueden sufrir los pesticidas a la hora de su cuantificación. Los resultados encontrados pueden verse en la **Tabla V.8.5**.

Tabla V.8.5. Evaluación del *Efecto Matriz* en rectas ($n=5$) elaboradas en disolvente y en matriz procedente del método *QuEChERS* por *UPLC-MS/MS*. El rango lineal estudiado fue desde $0-300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

	RECTA DISOLVENTE		RECTA <i>QuEChERS</i>		EFECTO MATRIZ	TIPO
	<i>Pdte</i>	r^2	<i>Pdte</i>	r^2		
DIFLUFENICAN	91,73	0,9964	70,48	0,9984	23%	SUPRESION
CLORPIRIFOS	16,41	0,9973	10,94	0,9854	33%	SUPRESION
FOSMET	340,63	0,9996	173,76	0,9990	49%	SUPRESION
DIURON	308,60	0,9995	388,53	0,9996	-26%	AUMENTO
TBA	4289,4	0,9980	3964,10	0,9993	8%	SUPRESION
DIMETOATO	301,45	0,9997	109,74	0,9998	64%	SUPRESION
AMITROL	21,15	0,9991	17,22	0,8737	19%	SUPRESION

Las rectas en matriz *QuEChERS* dan lugar a un acusado efecto matriz de la señal analítica cuya intensidad varía en función del pesticida en estudio, únicamente la TBA mostró un leve efecto matriz tal y como ha sido estudiado en apartados anteriores. Todos los pesticidas estudiados dieron lugar a un efecto de supresión a consecuencia del efecto matriz, a excepción del Diuron que la presencia de matriz daría lugar a un aumento de señal.

Por otra parte, no se consiguió una buena linealidad en las rectas de calibración en matriz para el Amitrol, de lo que se puede deducir que este método no es adecuado para la determinación de este pesticida.

V.8.3.3.3. Estudio de recuperación en muestras fortificadas.

El método de extracción QuEChERS fue aplicado a un total de 15 muestras, que fueron fortificadas a tres niveles de concentración como previamente ha sido descrito. Para ello se introdujeron en los tubos de extracción 125 µL de una disolución mezcla de pesticidas a 1,6, 8 y 20 mg·L⁻¹, respectivamente, junto con los 10 g de masa molida.

Los resultados medios analizados pueden verse resumidos en la **Tabla V.8.6**. Los resultados correspondientes al Amitrol y Oxyfluorfen no han sido evaluados, debido a la imposibilidad de calibrar sus correspondientes rectas en matriz.

Tabla V.8.6. Porcentajes de recuperación medios ($n=5$) obtenidos a través del método QuEChERS en muestras fortificadas directamente en la masa a tres niveles de concentración.

PESTICIDAS	20 ppb	100 ppb	250 ppb
Diflufenican	<i>n.d.</i>	14 (4)	72 (14)
Clorpirifos	56 (5)	80 (5)	96 (16)
Fosmet	80 (3)	75 (3)	95 (9)
Diuron	46 (9)	44 (4)	84 (7)
TBA	70 (1)	75 (1)	87 (2)
Dimetoato	82 (1)	82 (2)	80 (1)

Los resultados obtenidos a través de este método a los tres niveles de fortificación estudiados mostraron recuperaciones entre 44-96%.

En pesticidas como Fosmet, Dimetoato, Clorpirifos o TBA se obtuvieron valores cercanos al 80% de recuperación. No obstante, el

método QuEChERS no logró buenas recuperaciones para pesticidas como el Diflufenican o el Diuron, en los que prácticamente no fue posible extraer más del 46% en el caso del Diuron, o del 14% en el caso del Diflufenican a niveles de concentración menores a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Mejores resultados se encontraron para estos dos pesticidas al nivel de fortificación de $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

V.8.4. Estudio y cuantificación de la contaminación por residuos de pesticidas en aceitunas a través del método ASEL.

V.8.4.1. Introducción.

Una vez optimizadas y validadas las condiciones del método ASEL, se procedió a evaluar su potencial frente a otros tratamientos de determinación de pesticidas en aceitunas. Aunque como fue estudiado anteriormente dicho método no requiere etapas de purificación previas a la inyección de los extractos en el sistema UPLC-MS/MS, dado que los extractos además fueron analizados por GC-MS, se incluyó una etapa de purificación a través de columnas de Florisil en los extractos analizados por esta técnica.

V.8.4.2. Metodología.

Para la realización del método ASEL se tomaron muestras de 30 g de aceitunas de la *var. Picual* procedentes de muestras que previamente habían sido fortificadas a tres niveles de concentración de 20, 100 y $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en muticapa como ya fue descrito en el *apartado V.1.2*. A

continuación, se sometió a las muestras a las condiciones del método ASEL optimizadas anteriormente.

Finalizada la etapa de extracción, fue realizada una etapa de purificación haciendo pasar 10 mL de extracto por columnas de Florisil de 2 g. Las columnas fueron lavadas con 10 mL de ACN, y el volumen final de eluato se ajustó a 25 mL con ACN que fueron inyectados directamente al UPLC-MS/MS. Otros 10 mL del extracto sufrieron el mismo proceso pero fueron evaporados hasta sequedad y re-constituidos con mezcla ciclohexano: acetato de etilo (9:1) para poder ser analizados por GC-MS. La metodología seguida puede verse en la **Figura V.8.2**.

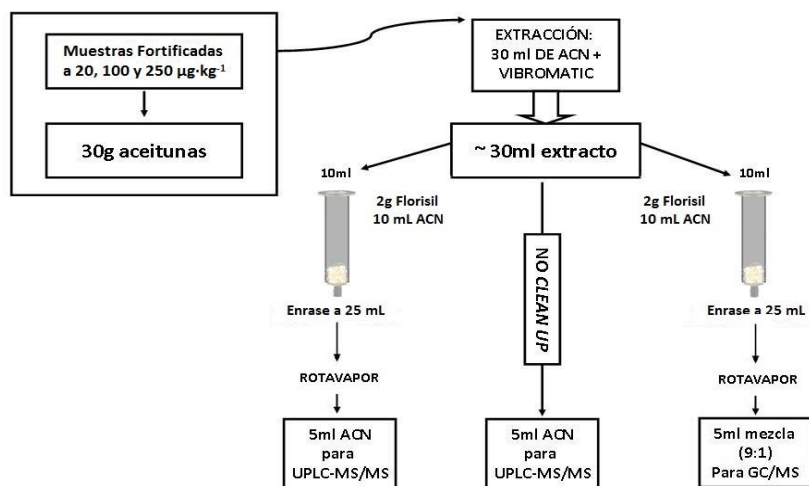


Figura V.8.2. Esquema de los diferentes tratamientos del extracto ASEL para su posterior análisis cromatográfico.

V.8.4.3. Resultados.

V.8.4.3.1. Cantidad de matriz co-extraída.

Para conocer la cantidad de matriz que es co-extraída por el tratamiento de ASEL se realizó un análisis gravimétrico a partir de los extractos procedentes de muestras de aceitunas por diferencia de peso antes y después de la evaporación del disolvente. Los resultados medios se muestran en la **Tabla V.8.7**.

A la vista de los resultados cabe destacar la pequeña cantidad de matriz que es extraída por el método ASEL, lejos de las cantidades extraídas por otros métodos de extracción como el que emplea el homogeneizador que se vio en el apartado anterior. Además, se puede observar que el Florisil disminuye la cantidad de matriz de los extractos en un 70%, lo cual es muy importante para evitar problemas en los equipos cromatográficos.

Tabla V.8.7. Cantidad de matriz media ($n=5$) co-extraída por el tratamiento ASEL con clean up empleando columnas de Florisil.

	Media	RSD
Antes del FI (mg/g)	2,38	6%
Tras el FI (mg/g)	0,75	12%

V.8.4.3.2. Efecto Matriz del tratamiento del ASEL.

Como en el caso anterior, para evaluar el *Efecto Matriz* se comparó la desviación de las pendientes de las rectas de calibrado elaboradas en matriz con las pendientes de las rectas en disolvente. Los resultados se muestran en la **Tabla V.8.8**.

Tabla V.8.8. Evaluación del *Efecto Matriz del método ASEL* con o sin empleo de etapa de purificación con Florisil. El rango lineal estudiado fue desde 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

	RECTA DISOLVENTE		RECTA ASEL <i>sin FI</i>		RECTA ASEL <i>con FI</i>		EFECTO MATRIZ		EFECTO
	<i>Pdte</i>	r^2	<i>Pdte</i>	r^2	<i>Pdte</i>	r^2	Método	Florisil	
DIFLUFENICAN	83,40	0,9926	79,60	0,9968	73,06	0,9948	5%	12%	SUPRESION
FOSMET	321,44	0,9978	254,17	0,9999	251,90	0,9987	21%	22%	SUPRESION
DIURON	300,16	0,9959	238,11	0,9998	217,15	0,9933	21%	28%	SUPRESION
TBA	4140,30	0,9955	3941,30	0,9940	3513,60	0,9982	5%	15%	SUPRESION
DIMETOATO	330,40	0,9944	211,04	0,9989	223,85	0,9991	36%	32%	SUPRESION
AMITROL	24,11	0,9934	11,98	0,9912	12,10	0,9947	50%	50%	SUPRESION

A la vista de los resultados se comprueba la existencia de un Efecto Matriz que fue de supresión en todos los pesticidas estudiados. Dicho efecto fue más pronunciado en pesticidas como Amitrol o Dimetoato mientras que fue muy leve en el caso del Diflufenican o TBA.

La inclusión de una etapa de purificación de los extractos no produjo grandes diferencias en lo que se refiere a las pendientes de las rectas, comprobando así que la inclusión de una etapa de *clean up* con Florisil no afecta a la determinación de los analitos.

V.8.4.3.3. Resultados obtenidos.

El método de extracción ASEL fue aplicado en un total de 5 muestras porcedentes de cada uno de los tres niveles de concentración e inyectadas en UPLC-MS/MS sin etapa de purificación previa por *Florisil*, ya que como ha sido comprobado anteriormente, no introduce errores en la determinación de los analitos. Dicha etapa de limpieza si fue necesaria para el caso de la determinación de Oxifluorfen por GC-MS. Los resultados medios pueden verse resumidos en la **Tabla V.8.9**.

Tabla V.8.9. Porcentajes de recuperación medios ($n=5$) obtenidos tras la aplicación del método ASEL sobre aceitunas fortificadas a tres niveles de concentración. Las muestras se analizaron por UPLC-MS/MS y el oxifluorfen por GC-MS (Regresión lineal en Disolvente $y=109,03x-1880,82$; $r^2=0,9950$ mientras que en Matriz $y=139,48x-503,83$ con un $r^2=0,9995$. Efecto Matriz del 28%).

PESTICIDAS	20 ppb	100 ppb	250 ppb	Rec Media
Diflufenican	79 (12)	97 (9)	94 (15)	90 (11)
Fosmet	104 (7)	102 (10)	107 (6)	104 (2)
Diuron	74 (14)	85 (11)	87 (16)	82 (9)
TBA	92 (11)	92 (12)	101 (9)	95 (5)
Dimetoato	71 (10)	72 (17)	76 (8)	73 (4)
Amitrol	<i>n.d.</i>	14 (7)	19 (7)	17 (21)
Oxifluorfen	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	85 (30)	----

El método ASEL obtuvo buenos porcentajes de recuperación, los cuales oscilaron entre un 71 y 107% para la mayoría de los pesticidas estudiados. Las recuperaciones fueron anormalmente bajas para el Amitrol, aunque dentro de los límites establecidos durante la

validación del método. El oxifluorfen por GC-MS no fue detectado al nivel más bajo de concentración, pero si al nivel de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

V.8.5. Análisis comparativo de los tratamientos en estudio.

Tras el análisis de los tres procedimientos de extracción de pesticidas en aceitunas por separado, se procedió a comprobar la validez del método ASEL a partir de los resultados obtenidos por los tres tratamientos estudiados comparando diferentes parámetros. Para ello, tres estudios fueron realizados: *Cantidad de Matriz co-extraída*, *Efecto Matriz* y *Recuperaciones* medias de cada uno de los tratamientos.

V.8.5.1. Comparación de la cantidad de matriz co-extraída.

La cantidad de matriz co-extraída en un tratamiento de extracción de pesticidas es un parámetro importante a determinar puesto que genera información preliminar sobre su posible Efecto Matriz. Es por ello que la cantidad de matriz co-extraída en los tres procedimientos de análisis de pesticidas estudiados fue comparada. Los resultados pueden verse en la

Tabla V.8.10.

Tabla V.8.10. Cantidad de matriz co-extraída (*RSD*) en los tres tratamientos en estudio. *CU: clean up*.

	Ultraturrax + FI		QuEChERS		ASEL	
	Antes CU	Tras CU	Antes CU	Tras CU	Antes CU	Tras CU
<i>mg/g</i>	47,40 (3)	9,75 (8)	16,41 (4)	6,05 (15)	2,38 (12)	0,75 (26)
Reducción por CU	79% disminución		63% disminución		68% disminución	

A la vista de los resultados se puede apreciar que todos los tratamientos de *clean up* eliminaron gran parte de la matriz que contenían los extractos, con más del 70% del contenido en matriz. El método ASEL con o sin etapa de *clean up* dio lugar a los valores más bajos de cantidad de matriz, mientras que el método de extracción por Ultraturrax generó los valores más altos.

El método QuEChERS genera poca cantidad de matriz siempre y cuando se aplique su etapa de *clean up*. Finalmente, se puede decir que el método ASEL generaría menor cantidad de matriz aun sin el uso de una etapa de *clean up*, lo que mejoraría no sólo la calidad del extracto sino que además, disminuiría el número de etapas del método generando así una disminución en el tiempo de análisis.

V.8.5.2. Evaluación del Efecto Matriz.

Como ya se mencionó anteriormente, para evaluar la mayor o menor influencia del *Efecto Matriz* causada por cada uno de los tratamientos nos basamos en el estudio y la clasificación publicada en el año 2008 por *B. Kmellár et al*¹⁹⁸.

La evaluación del Efecto Matriz fue realizada a partir de rectas elaboradas en disolvente y en matriz procedente de los tres procedimientos en estudio que fueron construidas en el rango lineal de 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y analizadas por UPLC-MS/MS. Los resultados se muestran

gráficamente en la **Figura V.8.3.** donde se muestra una comparación del efecto matriz del método ASEL frente a los otros dos métodos en estudio.

Se puede destacar *a priori* que el Efecto Matriz varía en función del pesticida y del tratamiento aplicado. No obstante, el Efecto es mayor en el procedimiento de extracción con homogeneizador y QuEChERS, mientras que es menor para el método ASEL, ya que como se describió en el apartado anterior también su cantidad de matriz es menor, lo cual genera menores desviaciones frente a la recta en disolvente.

Cabe mencionar, que mientras el efecto matriz es de *supresión* para la mayoría de los pesticidas extraídos por los métodos QuEChERS y ASEL, el método de extracción con homogeneizador dio lugar a un diferente efecto en función del pesticida, produciendo una *supresión de la señal* en los pesticidas Fosmet, Diuron y TBA, mientras que generó un *aumento de la señal* en Diflufenican, Dimetoato y Amitrol.

Finalmente, podemos decir que el método de ASEL fue quien dio lugar a un menor *Efecto Matriz*, cosa que se corresponde con la menor cantidad de matriz en peso seco co-extraída.

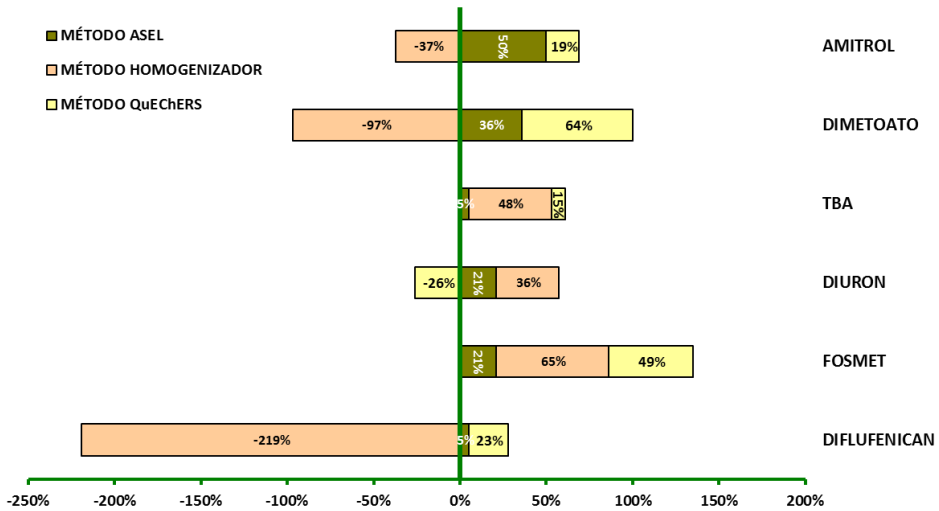


Figura V.8.3. Comparación del *Efecto Matriz* en función del pesticida y del procedimiento aplicado: ASEL sin *clean up*, Extracción con homogeneizador + SPE con Florisil y Extracción QuEChERS con *clean up*.

V.8.5.3. Análisis de los porcentajes de recuperación.

Para la comparación de las recuperaciones medias de los tres tratamientos en estudio se escogió el *Análisis de la Varianza de un factor* (ANOVA). Los datos a comparar correspondieron a los porcentajes de recuperación medios de cada nivel de fortificación.

El nivel de significancia estadística escogido fue el 5% (0,05), de modo que aquellos valores del estadístico que generasen un *p-valor* (probabilidad) < 0,05 rechazarían la hipótesis de que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y que al menos uno de los grupos es distinto. En la **Tabla V.8.11.** se muestra de forma resumida los valores

medios encontrados para cada pesticida en cada uno de los tratamientos y el valor de su estadístico.

Tabla V.8.11. Comparación de los métodos ASEL, QuEChERS y extracción con Ultraturrax + Florisil en función de sus porcentajes de recuperación a través del análisis estadístico de la varianza de un factor ANOVA.

	ASEL	Homogeneizador	QUECHERS	ANOVA <i>p</i> -valor	Existen Diferencias Significativas	GRUPO DIFERENTE
DIFLUFENICAN	90 (11)	96 (6)	39 (77)	0,016	SI	QUECHERS
FOSMET	104 (2)	86 (4)	83 (12)	0,014	SI	ASEL
DIURON	82 (9)	108 (9)	58 (39)	0,017	SI	QUECHERS
TBA	95 (5)	96 (4)	77 (11)	0,018	SI	QUECHERS
DIMETOATO	73 (4)	70 (7)	81 (1)	0,012	SI	Homogeneizador

A la vista de los resultados se puede concluir que los 3 métodos de extracción son buenos procedimientos de determinación de pesticidas, sin embargo, existe un método que ofrece mejores resultados en función de la naturaleza del pesticida.

En el caso del Diflufenican y de Diuron, el método QuEChERS ofreció muy pobres resultados (39 y 58%, respectivamente) siendo no comparable estadísticamente a los otros dos métodos en estudio. Buenas recuperaciones fueron encontradas para el Dimetoato por los tres métodos en estudio, aunque los valores en el caso de la extracción con QuEChERS fueron algo mayores. El Fosmet y la TBA fueron bien determinados por los tres tratamientos, si bien cabe destacar que el método ASEL dio unos porcentajes de recuperación algo mayores al resto.

Un resumen de los parámetros evaluados en los tres procedimientos en estudio junto con otros criterios a tener en cuenta puede verse resumido en la **Tabla V.8.12.**

Tabla V.8.12. Resumen de las principales características de los procedimientos de extracción en estudio: ASEL, Quechers y homogeneizador.

ELEMENTO	Método con Homogeneizador	Método QuEChERS	Método ASEL
Molienda Previa	SI	SI	NO
Método de extracción	Sólido-Líquido	Sólido-Líquido	Sólido-Líquido
Reactivos, Materiales & Disolventes	<ul style="list-style-type: none"> - ACN como extractante - Homogeneizador de gran potencia (Ultraturrax). - Evaporador a vacío. 	<ul style="list-style-type: none"> - ACN como extractante. - MgSO₄ + NaCl - Homogeneizador vortex. 	<ul style="list-style-type: none"> - ACN como extractante. - Agitador Vibromatic.
Necesidad de <i>clean up</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Sistema de filtración a vacío con filtros de 0.45µm. - Columnas de SPE de Florisil. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tubos Falcon rellenos de MgSO₄ + C₁₈ + PSA + GCB. - Homogeneizador Vortex. - Centrífuga. - Filtros de 0.2 µm. 	<ul style="list-style-type: none"> - NO. - Filtros de 0.2 µm.
Cantidad de matriz	47.4 mg·g ⁻¹ antes del <i>clean up</i> . 9.75 mg·g ⁻¹ tras el Florisil.	16.41 mg·g ⁻¹ antes del <i>clean up</i> . 6.05 mg·g ⁻¹ tras el <i>clean up</i> .	2.38 mg·g ⁻¹ SIN <i>clean up</i> . 0.75 mg·g ⁻¹ tras Florisil.
Efecto Matriz	SI, variable en función del pesticida analizado (36-220%).	SI, variable en función del pesticida analizado (8-64%).	SI, supresión del 12-50%.
Tiempo de extracción	Tiempo total estimado 60 min.	Tiempo total estimado > 3h.	Tiempo total estimado 20 min.
% Recuperación (100ppb)	> 71%	14-82%	> 71%
Adaptación a diferentes sistemas de detección	SI	SI	SI

V.8.5.4. Comparación con otros resultados recogidos en la bibliografía.

Aunque los tres tratamientos que han sido objeto de análisis han dado buenos resultados de recuperación y comparables entre sí, la determinación de pesticidas ha sido evaluada en los últimos años por otros métodos de extracción y detección ofreciendo resultados interesantes. Los más importantes en el terreno de la determinación de pesticidas en aceitunas se comparan a continuación en la **Tabla V.8.13.** junto con los obtenidos por los tratamientos evaluados en el presente capítulo.

Tabla V.8.13. Recuperaciones medias obtenidas a través de la aplicación de diferentes procedimientos de extracción y determinación de pesticidas en muestras de aceitunas fortificadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

	ASEL	ULTRA TURRAX	Método QUECHERS	Ferrer MSPD ¹⁸⁶	Cunha QUECHERS ²¹⁵	Guardia-Rubio ² ULTRATURRAX ¹⁰⁸	Gilbert-López ²¹⁶ QUECHERS	MSPD
Diflufenican	90 (11)	100 (3)	14 (4)					
Clorpirifos	-----	-----	80 (5)			95 (11)		
Fosmet	104 (2)	87 (1)	75 (3)		93 (2)			
Diuron	82 (9)	99 (1)	44 (4)	86 (6)	77 (4)	82 (14)	105 (4)	58 (7)
TBA	95 (5)	100 (2)	75 (1)	108 (7)		136 (14)	87 (3)	54 (8)
Dimetoato	73 (4)	73 (6)	82 (2)	88 (7)	103 (2)	71 (22)	92 (4)	56 (4)
Amitrol	17 (21)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>					
Oxifluorfen	85 (30)	150 (8)	<i>n.d.</i>		78 (14) ²			
<i>mg/g</i> <i>matriz</i>	1,18	9,75	0,75					

¹. DSI-GC-MS

². GC-MS/MS

A la vista de los resultados, se puede afirmar que no existe un método único que extraiga el 100% de los pesticidas presentes en las aceitunas. Para el Diflufenican sólo tenemos datos a partir de los tratamientos

realizados en el presente capítulo, siendo el método ASEL y el de extracción con homogeneizador los que generaron mejores resultados.

En el caso del Clorpirifos, el método QuEChERS extrae cerca del 80% aunque por el método usado por Guardia-Rubio *et al.*¹⁰⁸ (2007) con *Ultraturrax* se consiguió un 95%.

El Fosmet únicamente fue analizado por el método QuEChERS publicado por S. Cunha *et al.*²¹⁵ en 2007 al igual que el Oxyfluorfen, obteniéndose excelentes resultados (entre 93 y 78%, respectivamente). Ambos resultados coinciden con las buenas recuperaciones obtenidas por el resto de métodos analizados en el presente capítulo.

Dimetoato, Diuron y TBA han sido bien extraídos por todos los métodos excepto por el MSPD propuesto por Gilbert-López *et al.*²¹⁶ (2010), en el que prácticamente no sobrepasa el 50% de recuperación, sin embargo si se extrajo adecuadamente por el MSPD de C. Ferrer *et al.*¹⁸⁶ publicado en 2005.

La comparación de los resultados descritos por los diferentes métodos de extracción de pesticidas en aceitunas publicados hasta la fecha con los del método ASEL, evidencia que el nuevo método puede extraer de forma eficaz la mayoría de pesticidas en estudio, obteniendo recuperaciones semejantes a las obtenidas por el resto de tratamientos y lo que es más importante, sin la incorporación de un mayor número de etapas analíticas, con menor uso de disolventes y con menor cantidad de matriz extraída.

V.9. APLICACIÓN DEL MÉTODO ASEL EN MUESTRAS REALES.

El método ASEL fue aplicado al análisis de muestras procedentes de un total de 366 muestras de aceitunas que fueron recogidas durante la campaña 2009-2010 en distintas zonas geográficas de la provincia de Jaén las cuales fueron suministradas por el *Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal* de dicha provincia.

De las 366 muestras fueron seleccionadas un total de 33 muestras de vuelo y 21 muestras de suelo en base a la información suministrada por el *Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal*. Las muestras seleccionadas fueron las que habían dado un resultado positivo en al menos uno de los pesticidas en estudio, entendiendo como positivo todo aquel residuo de pesticida que aparezca en la muestra por encima de $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Al analizar estas muestras por el método ASEL, únicamente un resultado fue aceptado como positivo si cumplía los siguientes requisitos establecidos durante la validación de la presente Memoria:

- la identidad de pico para cada uno de los pesticidas fue solo confirmada si se cumplía que:
 - el *ion ratio* se mantenía dentro del intervalo especificado durante la validación, cuyo límite de tolerancia máxima relativa se estableció como $\pm 30\%$,
 - los t_R debían entrar dentro del intervalo especificado para los patrones de pesticidas calibrados en la misma matriz,

- La variación entre las tres medidas debía ser inferior al 20%, es decir, $RSDs < 20\%$.

V.9.1. Aplicación del método ASEL en muestras de vuelo.

El método ASEL fue aplicado a un total de 33 muestras de vuelo. Los resultados medios de cada pesticida encontrados en cada una de las muestras analizadas se muestran en la **Tabla V.9.1**. En dicha Tabla, únicamente vienen reflejados los datos correspondientes a 23 de las 33 muestras ya que sólo éstas presentaron trazas cuantificables de alguno de los pesticidas en estudio. Además, no vienen reflejados datos para los pesticidas Amitrol, Oxyfluorfen y Clorpirifos puesto que o bien no se encontraron valores significativos o bien en las muestras en las que se encontraron no se cumplieron los tres requisitos de aceptación establecidos anteriormente.

A la vista de los resultados, podemos comprobar que los pesticidas más frecuentemente detectados fueron TBA y Diuron, encontrándose en 15 y 9 de las 33 muestras analizadas, respectivamente. No obstante, ninguna de ellas dio valores para un pesticida mayor a su LMR. Asimismo, cabe destacar que las muestras M11 y M23 mostraron unos contenidos en TBA de 33,89 y 34,51 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente, cercanos al valor de LMR para esta materia activa (50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). El resto de muestras positivas mostraron valores muy alejados de los LMR permitidos y por lo tanto, se puede concluir que de un total de 33 muestras de aceitunas únicamente habría dos muestras cercanas al LMR.

Tabla V.9.1. Contenido en pesticidas obtenido tras la aplicación del método ASEL en 33 muestras de aceitunas de vuelo analizadas por UPLC-MS/MS. Los resultados vienen expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ como la media \pm *sd* (RSDs). *. LMR a fecha de 07/07/2015 a través de Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) N° 396-2005.

	DIFLUFENICAN	FOSMET	DIURON	TERBUTILAZINA	DIMETOATO
M 1			5,63 \pm 0,23 (4)	2,56 \pm 0,22 (9)	4,13 \pm 0,14 (4)
M 2					1,28 \pm 0,13 (10)
M 3					4,66 \pm 0,46 (10)
M 4	39,95 \pm 1,88 (5)				
M 5				10,36 \pm 0,16 (2)	
M 6	25,97 \pm 1,93 (7)				
M 7	40,93 \pm 2,42 (6)				
M 8				5,94 \pm 0,54 (9)	
M 9			12,99 \pm 0,89 (7)	8,26 \pm 0,24 (3)	
M 10			3,54 \pm 0,36 (10)	5,77 \pm 0,36 (6)	35,60 \pm 0,68 (2)
M 11			4,54 \pm 0,79 (17)	33,89 \pm 0,29 (1)	
M 12				10,1 \pm 0,52 (5)	
M 13				3,53 \pm 0,63 (18)	
M 14			4,78 \pm 0,32 (7)	8,05 \pm 0,58 (7)	
M 15		1,86 \pm 0,22 (12)			
M 16				12,72 \pm 0,83 (6)	
M 17			4,05 \pm 0,23 (6)	5,71 \pm 0,13 (2)	
M 18			3,01 \pm 0,34 (11)	3,85 \pm 0,02 (0)	
M 19		65,07 \pm 4,57 (7)			
M 20			9 \pm 0,74 (8)	10,93 \pm 0,36 (3)	
M 21		7,93 \pm 1,44 (18)			
M 22				5,62 \pm 0,64 (11)	
M 23			8,33 \pm 0,07 (1)	34,51 \pm 1,70 (5)	
Muestras+	3	3	9	15	4
LMR	200	3000	200	50	2000

V.9.2. Aplicación del método ASEL en muestras de suelo.

El método ASEL fue aplicado al análisis de 21 muestras de aceitunas procedentes del suelo que fueron suministradas por el mismo Laboratorio. Los resultados de las muestras que cumplieron con las condiciones de aceptación citadas anteriormente pueden verse en la **Tabla V.9.2**.

Tabla V.9.2. Contenido en pesticidas obtenido tras la aplicación del método ASEL en 21 muestras de aceitunas de suelo analizadas por UPLC-MS/MS* y GC-MS**. Los resultados vienen expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ como la media \pm sd (RSDs). LMR a fecha de 07/07/2015 a través de Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) N° 396-2005.

MUESTRA	PESTICIDAS	Media \pm sd	RSD
M 1	Terbutilazina*	14,59 \pm 1,35	9%
	Dimetoato*	0,34 \pm 0,06	18%
M 2	Clorpirifos*	11,67 \pm 1,55	13%
	Fosmet*	3,51 \pm 0,41	12%
	Oxifluorfen**	79,36 \pm 14,60	18%
M 3	Oxifluorfen**	19,72 \pm 2,75	14%
M 4	Diflufenican*	1,01 \pm 0,16	16%
	Terbutilazina*	8,31 \pm 1,09	13%
M 5	Diflufenican*	6,09 \pm 1,04	17%
	Oxifluorfen**	39,32 \pm 6,28	16%
M 6	Fosmet*	7,00 \pm 1,33	19%

Los resultados encontrados al analizar muestras de suelo mostraron mayores cantidades de pesticidas a los encontrados en muestras de vuelo, como es el caso de las casi $80 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Oxifluorfen encontradas en la M2 o las $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de la M5. TBA, Clorpirifos y Diflufenican también se encontraron en las muestras pero en cantidades inferiores.

Como se puede observar en la tabla anterior, la precisión de los resultados de análisis en las muestras de aceituna del suelo es, en general, inferior a la correspondiente del árbol. Ello es debido a la gran heterogeneidad de las muestras procedentes del suelo, en las que además del fruto estaban presentes cantidades variables de elementos tales como tierra, piedras, hojas, etc.

Finalmente cabe destacar que ninguna de las muestras mostró valores en ninguno de los pesticidas analizados superior a su LMR.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un novedoso método rápido para la determinación simultánea en aceituna de cinco herbicidas (Amitrol, Oxifluorfen, Terbutilazina, Diuron y Diflufenican) y tres insecticidas (Fosmet, Clorpirifos y Dimetoato) empleados de forma habitual en el cultivo del olivo. El nuevo método consiste en un Análisis Superficial por Extracción Líquida o *ASEL* está basado en una extracción sólido-líquido del fruto entero mediante un lavado de la superficie de las aceitunas con el empleo de acetonitrilo como disolvente de extracción. Los pesticidas fueron determinados a través de la inyección directa de los extractos en el sistema UPLC-MS/MS, donde previamente se habían optimizado las condiciones de separación y detección de cada uno de los pesticidas por separado.
2. Durante el desarrollo del método *ASEL* han sido estudiadas numerosas variables para la optimización del proceso de extracción: tipo de extractante, relación peso de muestra/volumen de extractante, velocidad y tiempo de agitación, temperatura óptima de la extracción y número de extracciones necesarias para la correcta cuantificación de los pesticidas. Las condiciones finales del método fueron: acetonitrilo como disolvente de extracción en relación 1:1 al peso de muestra, agitación durante 10 min a 7500 rpm a través del empleo de un agitador mecánico en una única extracción. La temperatura a la que se realizó la extracción fue temperatura ambiente.

3. El estudio del *efecto matriz* fue evaluado a través de la relación de las pendientes de cada uno de los pesticidas calibrados en disolvente y en matriz. Dicho estudio reveló que existía un efecto matriz de supresión de la señal analítica en todos los pesticidas analizados, siendo su intensidad variable en función de la naturaleza del pesticida. De este modo, se concluyó que existía un efecto matriz *suave* en pesticidas como Terbutilazina, Diuron o Diflufenican, *medio* en Dimetoato, Clorpirifos o Fosmet y *fuerte* en Amitrol y Oxifluorfen. Por todo ello, se concluyó que la calibración de todos los pesticidas debería realizarse siempre en matriz, a pesar que la cantidad global de matriz contenida en los extractos era mínima.
4. A la vista de la existencia del citado efecto matriz en la cuantificación de los analitos, se procedió a estudiar la composición del extracto, comprobándose que los grupos de componentes mayoritarios presentes en la matriz del extracto fueron los pigmentos y la grasa total, con un 25 y 37% en peso, respectivamente.
5. La incorporación de una etapa de limpieza o *clean up* de los extractos fue evaluada a través del estudio de dos procedimientos de purificación. La purificación de los extractos fue estudiada empleando la mezcla de adsorbentes utilizada en el método QuEChERS. Dicha etapa influyó negativamente en la cuantificación

de los pesticidas, disminuyendo los valores de los porcentajes de recuperación con respecto a los homólogos sin purificar. La purificación de los extractos fue también estudiada incorporando una etapa de SPE usando cartuchos de Florisil. El paso de los extractos a través de Florisil eliminó gran parte de la carga de matriz de los extractos pero no consiguió mejorar los porcentajes de recuperación con respecto a aquéllos que no sufrieron dicha etapa. Por tanto, se descartó la introducción de una etapa de *clean up* del extracto durante el desarrollo del método ASEL.

6. La posible influencia del estado o nivel de maduración de las aceitunas sobre la determinación de los pesticidas fue evaluada tanto en el método ASEL como en el método QuEChERS a partir de la cantidad de matriz extraída y del efecto de dicha matriz sobre las rectas de calibración. Ambos métodos produjeron un efecto matriz que fue independiente del estado de maduración de las aceitunas y para ambos métodos se manifestó con supresión de la señal analítica. En cuanto al contenido en matriz, se observó cierta tendencia al aumento de la cantidad de matriz a medida que avanzaba la maduración del fruto aunque las diferencias no fueron significativas. El contenido en matriz del método ASEL fue un 60% menor al generado por el método QuEChERS.
7. Los ensayos de validación de la metodología desarrollada fueron llevados a cabo a través del estudio de diferentes parámetros

recomendados en la guía europea SANCO/12571/2013. El método ASEL fue validado en términos de selectividad y especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión, comprobándose que todos ellos cumplían con las directrices de la citada guía. En el caso del Amitrol y el Oxifluorfen no se cumplieron estos criterios, debido a la baja sensibilidad y al alto límite de cuantificación obtenidos.

8. Se ha estudiado la influencia de un lavado previo del fruto con agua en la determinación de su contenido en pesticidas mediante el método propuesto, comprobándose que dicho lavado no reduce el contenido en pesticidas que se obtiene por aplicación del presente método. Aunque dicha etapa disminuyó el contenido en matriz extraída, el lavado previo de las muestras con agua no provocaría la pérdida de pesticidas que estuvieran adheridos a la superficie del fruto.
9. Los resultados del nuevo procedimiento de extracción ASEL en la determinación del conjunto de pesticidas fueron comparados con los de otras dos metodologías de extracción como son el método QuEChERS y una adaptación del método utilizado por *los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba*. La cantidad de matriz co-extraída y la influencia de dicha matriz en la cuantificación de las materias activas fue notablemente inferior en el método ASEL. Con respecto a los porcentajes de recuperación, los valores globales obtenidos en los métodos ASEL y

de extracción con homogeneizador fueron similares, y ambos netamente superiores a los correspondientes al método QuEChERS.

10. Al comparar los resultados obtenidos por los diferentes métodos de extracción de pesticidas en aceitunas publicados hasta la fecha con los obtenidos por el método ASEL, se puede observar que el nuevo método puede extraer de forma eficaz la mayoría de pesticidas en estudio, obteniendo porcentajes de recuperación cercanos a los obtenidos por el resto de tratamientos y lo que es más importante, sin la incorporación de mayor número de etapas analíticas, con menor uso de disolventes y con menor cantidad de matriz extraída.
11. Finalmente, la validez del nuevo procedimiento fue evaluada a partir del estudio en muestras reales obtenidas en almazaras de la provincia de Jaén a partir de dos métodos cromatográficos de determinación: *GC-MS* y *UPLC-MS/MS*, no encontrándose contenidos superiores a los respectivos LMR.

REFERENCIAS

1. Carson, R. *Silent spring* . (Houghton Mifflin, 2002).
2. Miller Jr, G. T. & Spoolman, S. E. *Living in the Environment*. (CengageBrain. com, 2011).
3. Ritter, S. R. Pinpointing trends in pesticide use in 1939. *C&E News* (2009).
4. Barba, M. de L. A. *et al.* Convenio de Estocolmo Sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes.
5. Lobe, J. WHO urges DDT for malaria control Strategies. (2006).
6. Waxman, M. F. in *The Agrochemical and Pesticides Safety Handbook* (CRC Press, 2010).
7. Diccionario de la lengua española | Real Academia Española . **2014**,
8. NATIONS, F. A. N. D. A. O. O. F. T. H. E. U. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Adopted by the Hundred and Twenty-third Session of the FAO Council in November 2002*. (2005). at <<http://www.fao.org/docrep/018/a0220e/a0220e00.pdf>>
9. Organization, W. H. International Programme on Chemical Safety: The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard. <http://www>, (2014).
10. Europe), U. (United N. E. C. for. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. **Fourth Rev**, (2011).
11. Farrera, P. R. & Táchira, C. Acerca de los plaguicidas y su uso en la agricultura. *Rev. Digit. Ceniap Hoy* **6**, (2004).
12. Plantas), A. (Asociación E. para la P. de las. Evolución del mercado fitosanitario 2000-2010. <http://www.aepla.es/files/aepla%20memoria%202010.pdf> (2011).
13. Plantas), A. (Asociación E. para la P. de las. Memoria anual 2012. Cifras de mercado 2012. [http://www.aepla.es/files/Comunicacion%202013/Publicaciones/Memoria_AEPLA_2012.p df](http://www.aepla.es/files/Comunicacion%202013/Publicaciones/Memoria_AEPLA_2012.pdf) <http://www>, (2013).
14. Anuario - Anuario de Estadística - Publicaciones - Estadísticas - magrama.es . **2014**,
15. Estadística anual de consumo de productos fitosanitarios en la Agricultura - Estadísticas medios de producción - Agricultura - Estadísticas agrarias - Estadísticas - Agricultura - magrama.es . **2014**,
16. MINISTERIO DE AGRICULTURA, A. Y. M. A. *ANUARIO DE ESTADISTICA 2012*. (2012). at <http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2012/AE_2012_Completo.pdf>

17. Nations), F. (Food and A. O. of the U. No Title. <http://fao>, (2013).
18. Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE). Encuesta de Marco de Áreas de España. - ESYRCE (Encuesta de superficies y rendimientos de cultivos) - Agricultura - Estadísticas agrarias - Estadísticas - Agricultura - magrama.es . **2014**,
19. MAGRAMA. *Perfil Ambiental de España 2013. Informe basado en indicadores (NIPO: 280-14-148-8)*. (2013). at <http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/perfil_ambiental_2013.aspx#>
20. Arias-Estévez, M. *et al.* The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* **123**, 247–260 (2008).
21. Jáquez Matas, S. V. COMPORTAMIENTO DE PLAGUICIDAS PERSISTENTES EN EL MEDIO AMBIENTE. (2013).
22. Renaud, F. G., Leeds-Harrison, P. B., Brown, C. D. & Beinum, W. van. Determination of time-dependent partition coefficients for several pesticides using diffusion theory. *Chemosphere* **57**, 1525–1535 (2004).
23. Van der Zee, S. E. A. T. M. & Boesten, J. J. T. I. Pesticide leaching in heterogeneous soils with oscillating flow: approximations. *Third Work. Chem. Fate Mod. Pestic.* **132**, 167–179 (1993).
24. Scholtz, M. T. & Bidleman, T. F. Modelling of the long-term fate of pesticide residues in agricultural soils and their surface exchange with the atmosphere: Part II. Projected long-term fate of pesticide residues. *Sci. Total Environ.* **377**, 61–80 (2007).
25. Ghadiri, H., Rose, C. W. & Connell, D. W. Degradation of organochlorine pesticides in soils under controlled environment and outdoor conditions. *J. Environ. Manage.* **43**, 141–151 (1995).
26. Ferrari, F., Klein, M., Capri, E. & Trevisan, M. Prediction of pesticide volatilization with PELMO 3.31. *Chemosphere* **60**, 705–713 (2005).
27. Vidal, J. L. M., González-Rodríguez, M. J., Vega, A. B. & Frenich, A. G. Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la provincia de Almería. *Rev. Ecosistemas* **13**, (2004).
28. Tang, X., Zhu, B. & Katou, H. A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies. *J. Environ. Sci.* **24**, 351–361 (2012).
29. Cerejeira, M. J. *et al.* Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Res.* **37**, 1055–1063 (2003).

30. Konstantinou, I. K., Hela, D. G. & Albanis, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ. Pollut.* **141**, 555–570 (2006).
31. Baird, C. *Química ambiental*. (Reverté, 2001).
32. Sanusi, A., Millet, M., Mirabel, P. & Wortham, H. Comparison of atmospheric pesticide concentrations measured at three sampling sites: local, regional and long-range transport. *Sci. Total Environ.* **263**, 263–277 (2000).
33. D. Torres, T. C. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. <http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/201> **13**, Revista Ecosistemas; Vol 13, No 3 (2004): Septiembre
34. Carvalho, F. P., Nhan, D. D., Zhong, C., Tavares, T. & Klaine, S. in *Boletín del OIEA* **40**, 24–30 (Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), 1998).
35. REASONED OPINION ON THE POTENTIAL CHRONIC AND ACUTE RISK TO CONSUMERS' HEALTH ARISING FROM PROPOSED TEMPORARY EU MRLS ACCORDING TO REGULATION (EC) NO 396/2005 ON MAXIMUM RESIDUE LEVELS OF PESTICIDES IN FOOD AND FEED OF PLANT AND ANIMAL ORIGIN. *EFSA Journal*, vol. 5, issue 3, 1-106. **2014**, 106 (2007).
36. Atisook, R., Kham-im, K., Toongsuwan, S., Punnakanta, L. & Panwiriyapong, S. Organochlorine compounds in perinatal blood samples; maternal and neonatal measurements at Siriraj Hospital. (1995).
37. WALISZEWSKI, S. M., PARDIO, V. T., WALISZEWSKI, K. N., CHANTIRI, J. N. & INFANZON, R. M. Levels of organochlorine pesticides in Mexican butter. *S.M. Waliszewski al., 'LEVELS Organochlor. Pestic. Mex. BUTTER', J. AOAC Int.* 79(3), 1996, pp. 784-786 **79**, 784–786 (1996).
38. Ortega-Ceseña, J., Espinosa-Torres, F. & López-Carrillo, L. El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Salud Pública Mex.* 1994; 36624-632 **36**, 624–632 (1994).
39. Hayes, W. J. *Pesticides studied in man*. (Williams & Wilkins, 1982).
40. Amaral Mendes, J. J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 781–788 (2002).
41. Lemaire, G., Terouanne, B., Mauvais, P., Michel, S. & Rahmani, R. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **196**, 235–246 (2004).

-
42. Cox, S., Niskar, A. S., Venkat Narayan, K. M. & Marcus, M. Prevalence of Self-Reported Diabetes and Exposure to Organochlorine Pesticides among Mexican Americans: Hispanic Health and Nutrition Examination Survey, 1982–1984. *Env. Heal. Perspect.* 2007 December; **115**(12) 1747–1752. **115**, 1747 (2007).
43. Nasterlack, M. in *Encyclopedia of Environmental Health* (ed. Nriagu, J. O.) 412–418 (Elsevier, 2011). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00588-2
44. Rosenstock, L., Keifer, M., Daniell, W. E., McConnell, R. & Claypoole, K. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. *Orig. Publ. as Vol. 2, Issue 8761* **338**, 223–227 (1991).
45. Reed, N. R. & Lim, L. O. in *Encyclopedia of Environmental Health* (ed. Nriagu, J. O.) 283–290 (Elsevier, 2011). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00571-7
46. Starks, S. E. *et al.* Neurobehavioral function and organophosphate insecticide use among pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Neurotoxicol. Teratol.* **34**, 168–176 (2012).
47. Ross, M. K. in *Encyclopedia of Environmental Health* (ed. Nriagu, J. O.) 702–708 (Elsevier, 2011). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00608-5
48. Hughes, M. F. & Edwards, B. C. In vitro dermal absorption of pyrethroid pesticides in human and rat skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **246**, 29–37 (2010).
49. Soderlund, D. M. *et al.* Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* **171**, 3–59 (2002).
50. Baños Hernández, I., Ricardo Hernández Campos, P., Valdés Carrillo, R. & Castillo García, I. Exposición a pesticidas y altas temperaturas. Su influencia negativa en la fertilidad masculina. *Rev. Int. Andrología* **5**, 146–154 (2007).
51. Baños Hernández, I., Valdés Carrillo, R. & Castillo García, I. Alteraciones en la fertilidad masculina por exposición a pesticidas. *Rev. Int. Andrología* **7**, 98–105 (2009).
52. Domínguez Hernández, H. Consejo de Ministros de Medio Ambiente. *Rev. Ambient. nº 64, marzo 2007. 2007 Año Polar Int.* **64**, 34–41 (2007).
53. CODEX Alimentarius: Home . **2014**,
54. Alimentarius, C. PESTICIDES RESIDUES IN FOOD. *Codex Aliment. Pestic. Residues Food. Methods Anal. Sampling, 2nd ed., Vol. 2A, 2000, Part 1.* **2A**, (2000).

-
55. Reynolds, S. L. in *Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues* 75 (Elsevier, 2004).
56. Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Paniagua-Marcos, P. H. & Hernández-Méndez, J. Analysis of pesticide residues in matrices with high lipid contents by membrane separation coupled on-line to a high-performance liquid chromatography system. *J. Chromatogr. A* **869**, 427–439 (2000).
57. Babić, S., Petrović, M. & Kaštelan-Macan, M. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. *J. Chromatogr. A* **823**, 3–9 (1998).
58. Luque-García, J. L. & Luque de Castro, M. D. Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta* **64**, 571–577 (2004).
59. Falandysz, J. *et al.* Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/Oder river estuary, Baltic Sea. *Food Chem.* **87**, 17–23 (2004).
60. Bouaid, A., Martín-Esteban, A., Fernández, P. & Cámara, C. Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius J Anal Chem.* 2000 Jun;367(3)291-4. **367**, 291–294 (2000).
61. Garrido Frenich, A., Martínez Salvador, I., Martínez Vidal, J. L. & López-López, T. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC–MS/MS and LC–MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* December 2005, Vol. 383, Issue 7-8, pp 1106-1118 **383**, 1106–1118 (2005).
62. Lehotay, S. J. *et al.* Determination of pesticide residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **85**, 1148–1166 (2002).
63. Bruno, T. J. & Svoronos, P. D. N. *Handbook of Basic Tables for Chemical Analysis*. **2**, (CRC Press, 2003).
64. *The Pesticide Manual. Sixteenth Edition*. **16th**, (British Crop Production Council, 2012).
65. Lehotay, S. J., Lightfield, A. R., Harman-Fetcho, J. A. & Donoghue, D. J. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4589–4596 (2001).
66. Schenck, F. J. & Lehotay, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *J. Chromatogr. A* **868**, 51–61 (2000).

-
67. Suchan, P., Pulkrabová, J., Hajšlová, J. & Kocourek, V. Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. *First Int. Symp. Recent Adv. Food Anal. Prague, Czech Republic, Nov. 2003* **520**, 193–200 (2004).
68. Gfrerer, M., Chen, S., Lankmayr, E. P., Quan, X. & Yang, F. Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1861–1867 (2004).
69. Blasco, C., Font, G. & Picó, Y. Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–ion trap–triple stage mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1098**, 37–43 (2005).
70. Juan-García, A., Font, G., Juan, C. & Picó, Y. Pressurized liquid extraction and capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in fruits from Valencian markets, Spain. *Food Chem.* **120**, 1242–1249 (2010).
71. Motohashi, N., Nagashima, H. & Párkányi, C. Supercritical fluid extraction for the analysis of pesticide residues in miscellaneous samples. *J. Biochem. Biophys. Methods* **43**, 313–328 (2000).
72. Lage Yusty, M. A. & Cortizo Daviña, J. L. Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control* **16**, 59–64 (2005).
73. King, J. W., Johnson, J. H., Taylor, S. L., Orton, W. L. & Hopper, M. L. Simultaneous multi-sample supercritical-fluid extraction of food products for lipids and pesticide residue analysis. *J. Supercrit. Fluids* **8**, 167–175 (1995).
74. Anastassiades, M. & Schwack, W. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A* **825**, 45–54 (1998).
75. Norman, K. N. T. & Panton, S. H. W. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residues in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **907**, 247–255 (2001).
76. You, J. *et al.* Determination of triazines in infant nutrient cereal-based foods by pressurized microwave-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **856**, 278–284 (2007).
77. Zougagh, M., Bouabdallah, M., Salghi, R., Hormatallah, A. & Rios, A. 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. *J. Chromatogr. A* **1204**, 56–61 (2008).
78. Satpathy, G., Tyagi, Y. K. & Gupta, R. K. A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE)–dispersive solid-phase extraction (d-SPE)–retention time locked (RTL)–gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* **127**, 1300–1308 (2011).
79. Hernández-Borges, J., Cabrera, J. C., Rodríguez-Delgado, M. Á., Hernández-Suárez, E. M. & Saúco, V. G. Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain). *Food Chem.* **113**, 313–319 (2009).
80. Fuentes, E., Báez, M. E. & Quiñones, A. Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. *J. Chromatogr. A* **1207**, 38–45 (2008).
81. Fuentes, E., Báez, M. E. & Díaz, J. Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for the determination of organophosphorus pesticides in olive and avocado oil. *J. Chromatogr. A* **1216**, 8859–8866 (2009).
82. Rezić, I., Horvat, A. J. M., Babić, S. & Kaštelan-Macan, M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrason. Sonochem.* **12**, 477–481 (2005).
83. Prapamontol, T. & Stevenson, D. Rapid method for the determination of organochlorine pesticides in milk. *18th Int. Symp. Chromatogr. part I* **552**, 249–257 (1991).
84. Granby, K., Andersen, J. H. & Christensen, H. B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *First Int. Symp. Recent Adv. Food Anal. Prague, Czech Republic, Nov. 2003* **520**, 165–176 (2004).
85. Ramos, J. J., Rial-Otero, R., Ramos, L. & Capelo, J. L. Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. *J. Chromatogr. A* **1212**, 145–149 (2008).
86. Watanabe, E., Yoshimura, Y., Yuasa, Y. & Nakazawa, H. Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits. *Anal. Chim. Acta* **433**, 199–206 (2001).
87. Pap, T., Horváth, V., Tolokán, A., Horvai, G. & Sellergren, B. Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **973**, 1–12 (2002).
88. Pawliszyn, J. & Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*. **61**, (Wiley-Vch New York, 1997).

-
89. Aulakh, J. S., Malik, A. K., Kaur, V. & Schmitt-Kopplin, P. A Review on solid phase micro extraction—high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **35**, 71–85 (2005).
90. Menezes Filho, A., dos Santos, F. N. & de Paula Pereira, P. A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta* **81**, 346–354 (2010).
91. Tankiewicz, M., Morrison, C. & Biziuk, M. Multi-residue method for the determination of 16 recently used pesticides from various chemical groups in aqueous samples by using DI-SPME coupled with GC–MS. *Talanta* **107**, 1–10 (2013).
92. Möder, M., Popp, P., Eisert, R. & Pawliszyn, J. Determination of polar pesticides in soil by solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **363**, 680–685 (1999).
93. Rodríguez, R., Mañes, J. & Picó, Y. Off-line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits. *Anal. Chem.* **75**, 452–459 (2003).
94. Mee Kin, C. & Guan Huat, T. Headspace solid-phase microextraction for the evaluation of pesticide residue contents in cucumber and strawberry after washing treatment. *Food Chem.* **123**, 760–764 (2010).
95. Chai, M. K. & Tan, G. H. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chem.* **117**, 561–567 (2009).
96. Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Martín, M. T. & Mayorga, A. L. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* **829**, 269–277 (1998).
97. Rodrigues, F. de M. *et al.* Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. *Microchem. J.* **98**, 56–61 (2011).
98. Valenzuela, A. I., Lorenzini, R., Redondo, M. J. & Font., G. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. *J. Chromatogr. A* **839**, 101–107 (1999).
99. Zambonin, C. G., Quinto, M., De Vietro, N. & Palmisano, F. Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chem.* **86**, 269–274 (2004).

100. Tsoutsis, C. S. & Albanis, T. A. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **84**, 3–13 (2004).
101. Tsoutsis, C., Konstantinou, I., Hela, D. & Albanis, T. Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Instrum. Methods Anal. -IMA 2005* **573–574**, 216–222 (2006).
102. Cunha, S. C., Fernandes, J. O. & Oliveira, P. P. Comparison of matrix solid-phase dispersion and liquid-liquid extraction for the chromatographic determination of fenthion and its metabolites in olives and olive oils. *Food Addit. Contam.* **24**, 156–164 (2007).
103. Jones, L. R. & Riddick, J. A. Separation of organic insecticides from plant and animal tissues. *Anal. Chem.* **24**, 569–571 (1952).
104. Aramendía, M. A. *et al.* Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (MRM). *Food Chem.* **97**, 181–188 (2006).
105. Agustín, M. R. R., Park, H.-M., Hong, S.-M., Ryu, J.-C. & Lee, K.-B. Determination of mono-to octachlorobiphenyls in fish oil using Florisil adsorption followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1085**, 278–284 (2005).
106. Papadakis, E. N., Vryzas, Z. & Papadopoulou-Mourkidou, E. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1127**, 6–11 (2006).
107. Escuderos-Morenas, M. L., Santos-Delgado, M. J., Rubio-Barroso, S. & Polo-Diez, L. M. Direct determination of monolinuron, linuron and chlorbromuron residues in potato samples by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. *J. Chromatogr. A* **1011**, 143–153 (2003).
108. Guardia-Rubio, M., Marchal-López, R. M. & Ruiz-Medina, A. Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems. *J. Chromatogr. A* **1145**, 195–203 (2007).
109. Ballesteros, E., García Sánchez, A. & Ramos Martos, N. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1111**, 89–96 (2006).

110. Hernando, M. D. *et al.* Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1815–1831 (2007).
111. Fernández Moreno, J. L., Arrebola Liébanas, F. J., Garrido Frenich, A. & Martínez Vidal, J. L. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1111**, 97–105 (2006).
112. Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., Cruz Sicilia, A. D., González Rodríguez, M. J. & Plaza Bolaños, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **558**, 42–52 (2006).
113. Michulec, M. & Wardencki, W. Development of headspace solid-phase microextraction–gas chromatography method for the determination of solvent residues in edible oils and pharmaceuticals. *J. Chromatogr. A* **1071**, 119–124 (2005).
114. Fontcuberta, M. *et al.* Chlorinated organic pesticides in marketed food: Barcelona, 2001–06. *Sci. Total Environ.* **389**, 52–57 (2008).
115. Li, L. *et al.* Simplified pesticide multiresidue analysis of soybean oil by low-temperature cleanup and dispersive solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **90**, 1387–1394 (2007).
116. Dunovská, L., Čajka, T., Hajšlová, J. & Holadová, K. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **578**, 234–240 (2006).
117. García-Reyes, J. F., Hernando, M. D., Molina-Díaz, A. & Fernández-Alba, A. R. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC Trends Anal. Chem.* **26**, 828–841 (2007).
118. Przybylski, C. & Hommet, F. Evaluation of some parameters affecting troublesome pesticide analysis in gas chromatography–ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1201**, 78–90 (2008).
119. Yost, R. A. & Enke, C. G. Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2274–2275 (1978).
120. Yinon, J. & Vincze, A. Collision-induced dissociation (CID) processes in some carbamate and phenylurea pesticides studied by ion-trap MS/MS. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **167**, 21–33 (1997).

-
121. Cervera, M. I., Portolés, T., Pitarch, E., Beltrán, J. & Hernández, F. Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* **1244**, 168–177 (2012).
122. Cochran, J. Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides in tobacco. *J. Chromatogr. A* **1186**, 202–210 (2008).
123. Baranowska, I., Barchańska, H. & Pacak, E. Procedures of trophic chain samples preparation for determination of triazines by HPLC and metals by ICP-AES methods. *Environ. Pollut.* **143**, 206–211 (2006).
124. Willoughby, R. C., Sheehan, E. & Mitrovich, S. *A global view of LC/MS: how to solve your most challenging analytical problems*. **2nd**, (Global View Publ., 2002).
125. Gong, A. & Ye, C. Analysis of trace atrazine and simazine in environmental samples by liquid chromatography–fluorescence detection with pre-column derivatization reaction. *J. Chromatogr. A* **827**, 57–63 (1998).
126. Hernandez, F., Hidalgo, C. & Sancho, J. V. Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* **83**, 728–734 (2000).
127. Alder, L., Greulich, K., Kempe, G. & Vieth, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS? *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 838–865 (2006).
128. Lafont, F. *et al.* FORO DE LA TECNOLOGÍA OLEÍCOLA Y LA CALIDAD: Determinacion de Herbicidas en Aceite de Oliva Mediante GC-MS y/o HPLC-MS. *EXPOLIVA 2005. FORO DE LA TECNOLOGÍA OLEÍCOLA Y LA CALIDAD. TEC-10.* (2005). at <<http://www.expoliva.com/expoliva2005/simposium/comunicaciones.asp?anio=2005&codigo=TEC#TEC-10>>
129. Ali, M. S., White, J. D., Bakowski, R. S., Phillippo, E. T. & Ellis, R. L. Analyte stability study of N-methylcarbamate pesticides in beef and poultry liver tissues by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **76**, 1309–1316 (1992).
130. Ali, M. S. Determination of N-methylcarbamate pesticides in liver by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 586–592 (1989).
131. Prasad, R., Upadhyay, N. & Kumar, V. Simultaneous determination of seven carbamate pesticide residues in gram, wheat, lentil, soybean, fenugreek leaves and apple matrices. *Anal. Chem. Australas.* **111**, 91–96 (2013).

-
132. Picó, Y., Font, G., José Ruiz, M. & Fernández, M. Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 917–960 (2006).
133. Picó, Y. & Barceló, D. The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 821–835 (2008).
134. Leandro, C. C., Hancock, P., Fussell, R. J. & Keely, B. J. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1103**, 94–101 (2006).
135. Ibáñez, M., Pozo, Ó. J., Sancho, J. V, López, F. J. & Hernández, F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1081**, 145–155 (2005).
136. Ibáñez, M., Pozo, Ó. J., Sancho, J. V, López, F. J. & Hernández, F. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1134**, 51–55 (2006).
137. Hernández, F., Sancho, J. V, Ibanez, M. & Grimalt, S. Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 862–872 (2008).
138. Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A. & Bernal, J. Multidimensional chromatography in food analysis. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7110–7129 (2009).
139. Dallüge, J., van Rijn, M., Beens, J., Vreuls, R. J. J. & Brinkman, U. A. T. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts. *J. Chromatogr. A* **965**, 207–217 (2002).
140. Kivilompolo, M., Obürka, V. & Hyötyläinen, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the analysis of antioxidant phenolic compounds in wines and juices. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 373–380 (2008).
141. Del Mar Caja, M., Blanch, G. P. & Ruiz del Castillo, M. L. Online RPLC-GC via TOTAD method to isolate (–)-methyl epijasmonate from lemon (*Citrus limon* Burm.). *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5475–5479 (2008).
142. Sanchez, R., Vazquez, A., Andini, J. C. & Villén, J. Automated multiresidue analysis of pesticides in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption–desorption interface. *J. Chromatogr. A* **1029**, 167–172 (2004).

-
143. Flores, G., Díaz-Plaza, E. M., Cortés, J. M., Villén, J. & Herraiz, M. Use of absorbent materials in on-line coupled reversed-phase liquid chromatography–gas chromatography via the through oven transfer adsorption desorption interface. *J. Chromatogr. A* **1211**, 99–103 (2008).
144. García-Reyes, J. F. *et al.* Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *TrAC Trends Anal. Chem.* **26**, 239–251 (2007).
145. Díaz-Plaza, E. M., Cortés, J. M., Vázquez, A. & Villén, J. Automated determination of pesticide residues in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface with electron-capture and nitrogen–phosphorus detectors operating. *ExTech 2007 9th Int. Symp. Adv. Extr. Technol. ExTech 2007 - 9th Int. Symp. Adv. Extr. Technol.* **1174**, 145–150 (2007).
146. Toledano, R. M., Cortés, J. M., Andini, J. C., Villén, J. & Vázquez, A. Large volume injection of water in gas chromatography–mass spectrometry using the Through Oven Transfer Adsorption Desorption interface: Application to multiresidue analysis of pesticides. *J. Chromatogr. A* **1217**, 4738–4742 (2010).
147. Cháfer-Pericás, C., Herráez-Hernández, R. & Campíns-Falcó, P. On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples. *J. Chromatogr. A* **1125**, 159–171 (2006).
148. Bidari, A., Ganjali, M. R., Norouzi, P., Hosseini, M. R. M. & Assadi, Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction. *Food Chem.* **126**, 1840–1844 (2011).
149. Cortés, J. M., Vázquez, A., Santa-María, G., Blanch, G. P. & Villén, J. Pesticide residue analysis by RPLC–GC in lycopene and other carotenoids obtained from tomatoes by supercritical fluid extraction. *Food Chem.* **113**, 280–284 (2009).
150. Freitas, L. G., Götz, C. W., Ruff, M., Singer, H. P. & Müller, S. R. Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1028**, 277–286 (2004).
151. Romero-González, R., Frenich, A. G. & Vidal, J. L. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* **76**, 211–225 (2008).
152. Morphet, J. & Hancock, P. Application Note: A rapid method for the screening and confirmation of over 400 pesticide residues in food. *A rapid method for the screening and confirmation of over 400 pesticide residues in food. Waters Corporation, Manchester, UK.*

- (2008). at
<<http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=10069469#sthash.yj7LRUYx.dpuf>>
153. Mezcua, M. *et al.* Application of ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater. *J. Chromatogr. A* **1109**, 222–227 (2006).
 154. T. Sunil Kumar Reddy, G. B. and A. S. K. ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: AN INTRODUCTION AND REVIEW . T. Sunil Kumar Reddy *al.* / Vol 2 / Issue 1 / 2012 / 24-31 **2**, 24–31 (2012).
 155. Mu Naushad, M. R. K. *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Evaluation and Applications in Food Analysis.* (2014).
 156. Skoog, D. A., F.J., H. & T.A., N. in *Principios de Analisis Instrumental* (ed. González, S. C.) **6**, 550 (Cengage Learning, 2001).
 157. Oriol, V. & Del Castillo, B. *Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. México DF, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco* **1**, (Fondo Editorial Universidad Norbert Wiener, 2009).
 158. Harvey, D. *Química Analítica Moderna.* (S.A. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA, 2002, 2002).
 159. Cappiello, A., Famigliani, G., Mangani, F. & Palma, P. A simple approach for coupling liquid chromatography and electron ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 265–273 (2002).
 160. Pomilio, A. B., Bernatené, E. A. & Vitale, A. A. Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* **45**, 47–79 (2011).
 161. Krueve, A., Künnapas, A., Herodes, K. & Leito, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1187**, 58–66 (2008).
 162. Fernández-Escobar, R., Barranco, D. & Rallo, L. *El cultivo del olivo.* (Mundi-Prensa, 2008).
 163. Aparicio, R. & Harwood, J. L. *Manual del aceite de oliva.* (Mundi Prensa Libros SA, 2003). doi:ISBN: 9788489922419
 164. Quiles, J. L., Ramírez-Tortosa, M. C., Gómez, J. A., Huertas, J. R. & Mataix, J. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chem.* **76**, 461–468 (2002).

165. Ruiz-Canela, M. & Martínez-González, M. A. Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas* **68**, 245–250 (2011).
166. Covas, M.-I. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* **55**, 175–186 (2007).
167. Molina Díaz, A. *et al.* FORO DE LA TECNOLOGÍA OLEÍCOLA Y LA CALIDAD: Evaluación de la Efectividad del lavado de aceituna sobre la eliminación de residuos de plaguicidas: estudio de la situación real en almazaras y propuestas de mejora. *EXPOLIVA 2005, JAÉN*. (2005). at <<http://www.expoliva.com/expoliva2005/simposium/comunicaciones/TEC-47.pdf>>
168. Guardia Rubio, M., Ruiz-Medina, A., Molina-Díaz, A. & Ayora-Cañada, M. J. Pesticide residues in washing water of olive oil mills: effect on olive washing efficiency and decontamination proposal. *J. Sci. Food Agric.* **88**, 2467–2473 (2008).
169. Guardia Rubio, M., Ruiz Medina, A., Pascual Reguera, M. I. & Fernández de Córdoba, M. L. Multiresidue analysis of three groups of pesticides in washing waters from olive processing by solid-phase extraction-gas chromatography with electron capture and thermionic specific detection. *Microchem. J.* **85**, 257–264 (2007).
170. Guardia Rubio, M., Ruiz Medina, A., Molina Díaz, A. & Fernández de Córdoba, M. L. Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **29**, 1578–1586 (2006).
171. Guardia-Rubio, M., Ayora-Cañada, M. J. & Ruiz-Medina, A. Effect of Washing on Pesticide Residues in Olives. *J. Food Sci.* **72**, C139–C143 (2007).
172. Guardia Rubio, M., Ruiz Medina, A., Molina Díaz, A. & Ayora Cañada, M. J. Influence of harvesting method and washing on the presence of pesticide residues in olives and olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8538–8544 (2006).
173. Celik, G., Cinar, A., Cansev, A. & Sahan, Y. ISHS Acta Horticulturae 924: Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Olives Grown in Bursa, Turkey. in *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): Olive Trends Symposium-From the Olive Tree to Olive Oil: New Trends and Future Challenges* **924**, 157–160 (2010).
174. Amvrazi, E. G. & Albanis, T. A. Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chem.* **113**, 253–261 (2009).
175. Fuentes, E., Báez, M. E. & Díaz, J. Survey of organophosphorus pesticide residues in virgin olive oils produced in Chile. *Food Addit. Contam.* **3**, 101–107 (2010).

176. Sánchez, A. G., Martos, N. R. & Ballesteros, E. Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography–tandem mass-spectrometric determination. *Anal. Chim. Acta* **558**, 53–61 (2006).
177. Nieto, L. M., Hodaifa, G. & Casanova, M. S. Elimination of pesticide residues from virgin olive oil by ultraviolet light: Preliminary results. *J. Hazard. Mater.* **168**, 555–559 (2009).
178. Martínez Nieto, L., Hodaifa, G., Vives, S. R., Casares, J. A. & Casanova, M. S. Photodegradation of phytosanitary molecules present in virgin olive oil. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **203**, 1–6 (2009).
179. Fernandez-Alba, A. R. in *Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues* (ed. Amadeo R. Fernández-Alba) **Barceló**, (Access Online via Elsevier, 2004).
180. SANCO, D. G. EU Pesticides Database. Pesticide UE-MRLs: Regulation (EC) No 396/2005. Active Substances: Regulation (EC) No 1017/2009. **2008**, (2013).
181. Lentza-Rizos, C. & Avramides, E. J. in *Reviews of environmental contamination and toxicology* 111–134 (Springer, 1995).
182. Guardia Rubio, M., Fernández-De Córdoba, M. L., Ayora-Cañada, M. J. & Ruiz-Medina, A. Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1108**, 231–239 (2006).
183. Rastrelli, L., Totaro, K. & De Simone, F. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography. *Food Chem.* **79**, 303–305 (2002).
184. Aramendía, M. A. *et al.* Determination of herbicide residues in olive oil by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **105**, 855–861 (2007).
185. Yagüe, C. *et al.* Determination of pesticides and PCBs in virgin olive oil by multicolumn solid-phase extraction cleanup followed by GC-NPD/ECD and confirmation by ion-trap GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5105–5109 (2005).
186. Ferrer, C. *et al.* Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1069**, 183–194 (2005).
187. Anastassiades, M. QuEChERS. A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. *CVUA Stuttgart* (2005).

-
188. García-Reyes, J. F., Ferrer, C., Thurman, E. M., Fernández-Alba, A. R. & Ferrer, I. Analysis of herbicides in olive oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6493–6500 (2006).
189. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. & Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and 'dispersive solid-phase extraction' for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **86**, 412–431 (2003).
190. Cieslik, E., Sadowska-Rociek, A., Ruiz, J. M. M. & Surma-Zadora, M. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chem.* **125**, 773–778 (2011).
191. Lehotay, S. J., Maštovská, K. & Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* **88**, 615–629 (2005).
192. Lehotay, S. J. *et al.* Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* **90**, 485–520 (2007).
193. Standardization, E. C. for. CEN Standard Method EN 15662: Food of plant origin—determination of pesticide residues using GC–MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean up by dispersive SPE—QuEChERS method. . **2009**, (2013).
194. Payá, P. *et al.* Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1697–1714 (2007).
195. Lehotay, S. J. in *Pesticide Protocols J.L. Vidal*, 239–261 (Springer, 2006).
196. Maštovská, K. & Lehotay, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J. Chromatogr. A* **1040**, 259–272 (2004).
197. Nguyen, T. D., Yu, J. E., Lee, D. M. & Lee, G.-H. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chem.* **110**, 207–213 (2008).
198. Kmellár, B. *et al.* Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1215**, 37–50 (2008).

199. Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., Prestes, O. D. & Grió, S. L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 1477–1485 (2011).
200. Kmellár, B., Pareja, L., Ferrer, C., Fodor, P. & Fernández-Alba, A. R. Study of the effects of operational parameters on multiresidue pesticide analysis by LC–MS/MS. *Talanta* **84**, 262–273 (2011).
201. Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Alves, A. & Oliveira, M. B. P. P. Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. *J. Chromatogr. A* **1216**, 119–126 (2009).
202. Hancock, P., Leandro, C. C., Keely, B. J. & Fussell, R. J. Waters Applications Note: Determination of pesticides in food using UPLC with polarity switching tandem quadrupole LC/MS/MS. *Application Note Waters (2007) 720001995EN LB-PDF 720001995E*, (2007).
203. Leandro, C. C., Hancock, P., Fussell, R. J. & Keely, B. J. Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. *J. Chromatogr. A* **1144**, 161–169 (2007).
204. Nguyen, T. D., Lee, K. J., Lee, M. H. & Lee, G. H. A multiresidue method for the determination 234 pesticides in Korean herbs using gas chromatography mass spectrometry. *2009 Benedetti-Pichler Award*. **95**, 43–49 (2010).
205. Chen, G., Cao, P. & Liu, R. A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chem.* **125**, 1406–1411 (2011).
206. Furlani, R. P. Z., Marcilio, K. M., Leme, F. M. & Tfouni, S. A. V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food Chem.* **126**, 1283–1287 (2011).
207. Camino-Sánchez, F. J. *et al.* UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 427–440 (2011).
208. Sinha, S. N., Vishnu Vardhana Rao, M., Vasudev, K. & Odetokun, M. A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples. *Food Control* **25**, 636–646 (2012).

-
209. Hou, X., Han, M., Dai, X., Yang, X. & Yi, S. A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **138**, 1198–1205 (2013).
210. Lehotay, S. J. *et al.* Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **90**, 485–520 (2007).
211. Cieřlik, E., Sadowska-Rociek, A., Ruiz, J. M. M. & Surma-Zadora, M. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chem.* **125**, 773–778 (2011).
212. Wilkowska, A. & Biziuk, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.* **125**, 803–812 (2011).
213. Frenich, A. G., Vidal, J. L. M., Pastor-Montoro, E. & Romero-González, R. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 947–959 (2008).
214. Pareja, L., Cesio, V., Heinzen, H. & Fernández-Alba, A. R. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC–MS/MS. *Talanta* **83**, 1613–1622 (2011).
215. Cunha, S. C. *et al.* Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *J. Sep. Sci.* **30**, 620–632 (2007).
216. Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Lozano, A., Fernández-Alba, A. R. & Molina-Díaz, A. 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. *J. Chromatogr. A* **1217**, 6022–6035 (2010).
217. Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Fernández-Alba, A. R. & Molina-Díaz, A. Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3736–3747 (2010).
218. Benincasa, C., Perri, E., Iannotta, N. & Scalercio, S. LC/ESI–MS/MS method for the identification and quantification of spinosad residues in olive oils. *Food Chem.* **125**, 1116–1120 (2011).
219. Angioni, A., Porcu, L. & Pirisi, F. LC/DAD/ESI/MS Method for the Determination of Imidacloprid, Thiacloprid, and Spinosad in Olives and Olive Oil after Field Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 11359–11366 (2011).

220. Ruiz-Medina, A., Llorent-Martínez, E. J., Fernández-de Córdoba, M. L. & Ortega-Barrales, P. Automated optosensor for the determination of carbaryl residues in vegetable edible oils and table olive extracts. *J. Food Compos. Anal.* **26**, 66–71 (2012).
221. Barker, S. A., Long, A. R. & Short, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr. A* **475**, 353–361 (1989).
222. Viana, E., Moltó, J. C. & Font, G. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. *J. Chromatogr. A* **754**, 437–444 (1996).
223. Langowska, B. Sorbents in MSPD technique for determination of pesticide residues in plant material. *Prog.Plant Prot* **43**, 224–230 (2003).
224. Torres, C. M., Pico, Y. & Manes, J. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables by matrix solid phase dispersion (MSPD) and different gas chromatography element-selective detectors. *Chromatographia* **41**, 685–692 (1995).
225. CARDOSO, M. H. W. M., BASTOS, L. H. P., NEVES, T. S. & ABRANTES, S. Implementação da técnica de extração de dispersão da matriz em fase sólida ('MSPD') para determinação de resíduos de agrotóxicos em laranjas. *Ciênc.Tecnol.Aliment* **24**, 298–302 (2004).
226. Torres, C. M., Pico, Y., Marin, R. & Manes, J. Evaluation of organophosphorus pesticide residues in citrus fruits from the Valencian Community (Spain). *J. AOAC Int.* **80**, 1122–1128 (1997).
227. Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Donoso, A. & Tadeo, J. L. Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1043**, 127–133 (2004).
228. Albero, B., Sánchez-Brunete, C. & Tadeo, J. L. Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6915–6921 (2003).
229. Chu, X.-G., Hu, X.-Z. & Yao, H.-Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection. *J. Chromatogr. A* **1063**, 201–210 (2005).
230. Hu, Y.-Y., Zheng, P., He, Y.-Z. & Sheng, G.-P. Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1098**, 188–193 (2005).
231. Cai, J., Gao, Y., Zhu, X. & Su, Q. Matrix solid phase dispersion–Soxhlet simultaneous extraction clean-up for determination of organochlorine pesticide residues in tobacco. *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 869–874 (2005).

232. Ling, Y.-C. & Huang, I.-P. Multiresidue-matrix solid-phase dispersion method for determining 16 organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in fish. *Chromatographia* **40**, 259–266 (1995).
233. Sobhanzadeh, E., Bakar, N. K. A., Abas, M. R. Bin & Nemati, K. An efficient extraction and clean-up procedure for pesticide determination in olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 862–869 (2011).
234. Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Beatriz, M. & Oliveira, P. P. Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* **73**, 514–522 (2007).
235. Cunnif, P. Official Methods of Analyses of AOAC International: method 985.22. Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues. . **2005**, (2013).
236. Garcés-García, M., Morais, S., González-Martínez, M. Á., Puchades, R. & Maquieira, Á. Rapid immunoanalytical method for the determination of atrazine residues in olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 484–489 (2004).
237. Garcés-García, M., Brun, E. M., Puchades, R. & Maquieira, Á. Immunochemical determination of four organophosphorus insecticide residues in olive oil using a rapid extraction process. *Anal. Chim. Acta* **556**, 347–354 (2006).
238. Brun, E. M., Garcés-García, M., Puchades, R. & Maquieira, A. Highly sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for chlorpyrifos. application to olive oil analysis. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 9352–9360 (2005).
239. Campanella, L., Eremin, S., Lelo, D., Martini, E. & Tomassetti, M. Reliable new immunosensor for atrazine pesticide analysis. *Sensors Actuators B Chem.* **156**, 50–62 (2011).
240. Dugay, J. & Hennion, M.-C. Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters. *TrAC Trends Anal. Chem.* **14**, 407–414 (1995).
241. Bobeldijk, I., Broess, K., Speksnijder, P. & Van Leerdam, T. Determination of the herbicide amitrole in water with pre-column derivatization, liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **938**, 15–22 (2001).
242. Chicharro, M., Zapardiel, A., Bermejo, E. & Moreno, M. Determination of 3-amino-1, 2, 4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis. *Talanta* **59**, 37–45 (2003).

243. Takeda, S. *et al.* Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1051**, 297–301 (2004).
244. Girod, M., Delaurent, C. & Charles, L. Analysis of amitrole by normal-phase liquid chromatography and tandem mass spectrometry using a sheath liquid electrospray interface. *Rapid Commun. mass Spectrom.* **20**, 892–896 (2006).
245. Sun, Y., Liu, P. F., Wang, D., Li, J. Q. & Cao, Y. S. Determination of amitrole in environmental water samples with precolumn derivatization by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4540–4544 (2009).
246. Sánchez-Bayo, F., Hyne, R. V & Desseille, K. L. An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethyl-phosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. *Anal. Chim. Acta* **675**, 125–131 (2010).
247. Sánchez, F. G., Díaz, A. N., Pareja, A. G. & Bracho, V. Liquid chromatographic determination of asulam and amitrole with pre-column derivatization. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **20**, 603–615 (1997).
248. Guía SATA: Guía Uruguay para la Protección y Nutrición Vegetal. [www.laguia](http://www.laguia.org.uy), (2011).
249. (INECC), I. N. de E. y C. C. de M. Terbutilazina. <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/terbutilazina.pdf> [http://www](http://www.inecc.gob.mx),
250. Amvrazi, E. G. & Albanis, T. A. 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. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9642–9651 (2006).
251. University, C. Pesticide Management Education Program: Dimethoate. **2008**, (2013).
252. <http://www.farmex.com.pe/>. Pynrex 48 EC (Clorpirifos). Insecticida Agrícola INS. **2010**, (2014).
253. Registry, A. A. for T. S. and D. División de Toxicología ToxFAQsTM: Clorpirifos. **2009**, (2013).
254. Sánchez, A. G., Martos, N. R. & Ballesteros, E. Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography–tandem mass-spectrometric determination. *Anal. Chim. Acta* **558**, 53–61 (2006).
255. Walorczyk, S., Drożdżyński, D. & Gnusowski, B. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* **85**, 1856–1870 (2011).

-
256. Walorczyk, S. & Drożdżyński, D. Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry revisited. *J. Chromatogr. A* **1251**, 219–231 (2012).
257. Koesukwiwat, U., Lehotay, S. J., Miao, S. & Leepipatpiboon, N. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 6692–6703 (2010).
258. Okihashi, M., Kitagawa, Y., Akutsu, K., Obana, H. & Tanaka, Y. Rapid method for the determination of 180 pesticide residues in foods by gas chromatography/mass spectrometry and flame photometric detection. *J. Pestic. Sci.* **30**, 368–377 (2005).
259. Nguyen, T. D., Lee, B. S., Lee, B. R., Lee, D. M. & Lee, G. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. *Rapid Commun. mass Spectrom.* **21**, 3115–3122 (2007).
260. Yu, J., Wu, C. & Xing, J. Development of new solid-phase microextraction fibers by sol–gel technology for the determination of organophosphorus pesticide multiresidues in food. *J. Chromatogr. A* **1036**, 101–111 (2004).
261. Cajka, T., Hajslova, J., Lacina, O., Mastovska, K. & Lehotay, S. J. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection–low-pressure gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Trends Dev. Gas Chromatogr.* **1186**, 281–294 (2008).
262. Cunha, S. C., Fernandes, J. O. & Oliveira, M. B. P. P. Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid–liquid microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 8835–8844 (2009).
263. Song, Y. *et al.* Hapten synthesis and enzyme-linked immunosorbent assay for phosmet residues: assay optimization and investigation of matrix effects from different food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 2001–2008 (2009).
264. Wu, G. *et al.* Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC–MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup. *Food Chem.* **126**, 646–654 (2011).
265. Rodrigues, A. M., Ferreira, V., Cardoso, V. V., Ferreira, E. & Benoliel, M. J. Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *29th Int. Symp. Capill. Chromatogr.* **1150**, 267–278 (2007).

266. Scheyer, A., Morville, S., Mirabel, P. & Millet, M. Variability of atmospheric pesticide concentrations between urban and rural areas during intensive pesticide application. *Atmos. Environ.* **41**, 3604–3618 (2007).
267. Portolés, T., Pitarch, E., López, F. J. & Hernández, F. Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 303–315 (2011).
268. Gervais, G., Brosillon, S., Laplanche, A. & Helen, C. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *J. Chromatogr. A* **1202**, 163–172 (2008).
269. Lacina, O., Urbanova, J., Poustka, J. & Hajslova, J. Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 648–659 (2010).
270. Lazartigues, A. *et al.* Multiresidue method for the determination of 13 pesticides in three environmental matrices: water, sediments and fish muscle. *Talanta* **85**, 1500–1507 (2011).
271. Tian, H. Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **83**, 349–355 (2011).
272. Banerjee, K. *et al.* Multiresidue determination of 375 organic contaminants including pesticides, polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in fruits and vegetables by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with introduction of semi-quantification. *J. Chromatogr. A* (2012).
273. Sobhanzadeh, E., Abu Bakar, N. K., Abas, M. R. Bin & Nemati, K. Low temperature followed by matrix solid-phase dispersion-sonication procedure for the determination of multiclass pesticides in palm oil using LC-TOF-MS. *J. Hazard. Mater.* **186**, 1308–1313 (2011).
274. Berrada, H. Determinación de herbicidas derivados de la urea en aguas y vegetales. (Universitat de València - MEDICINA PREVENTIVA I SALUT PÚBLICA, BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL, 2002). at <<http://www.tesisenxarxa.net/TDX-1105103-093837/>>
275. Wang, Y., Xiao, L. & Cheng, M. Determination of phenylureas herbicides in food stuffs based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A* **1218**, 9115–9119 (2011).
276. Montoro, E. P., González, R. R., Frenich, A. G., Torres, M. & Vidal, J. L. M. Fast determination of herbicides in waters by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3585–3592 (2007).

277. Pozo, O. J. *et al.* Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1765–1771 (2007).
278. Ayano, E., Kanazawa, H., Ando, M. & Nishimura, T. Determination and quantitation of sulfonyleurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* **507**, 211–218 (2004).
279. Vidal, J. L. M. *et al.* Selection of a representative matrix for calibration in multianalyte determination of pesticides in vegetables by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Chromatographia* **61**, 127–131 (2005).
280. Garrido French, A., Martínez Vidal, J. L., López López, T., Cortés Aguado, S. & Martínez Salvador, I. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1048**, 199–206 (2004).
281. Bedendo, G. C., Jardim, I. C. S. F. & Carasek, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and detection by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta* **88**, 573–580 (2012).
282. Organization, W. H. *Terbutylazine (TBA) in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Originally published in Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1998. WHO/SDE/WS*, (1998).
283. Huang, Z., Li, Y., Chen, B. & Yao, S. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **853**, 154–162 (2007).
284. Galán-Cano, F., Lucena, R., Cárdenas, S. & Valcárcel, M. Dispersive micro-solid phase extraction with ionic liquid-modified silica for the determination of organophosphate pesticides in water by ultra performance liquid chromatography. *Microchem. J.* **106**, 311–317 (2013).
285. Birchfield, N. B. & Casida, J. E. Protoporphyrinogen oxidase: High affinity tetrahydropthalimide radioligand for the inhibitor/herbicide-binding site in mouse liver mitochondria. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1135–1139 (1996).
286. Robles-Molina, J., Gilbert-Lopez, B., García-Reyes, J. F., Martos, N. R. & Molina-Díaz, A. Multiclass determination of pesticides and priority organic pollutants in fruit-based soft drinks by headspace solid-phase microextraction/gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **3**, 2221–2230 (2011).

287. Laganà, A., Fago, G., Fasciani, L., Marino, A. & Mosso, M. Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* **414**, 79–94 (2000).
288. Zhang, H. *et al.* Microwave pretreatment and gas chromatography–mass spectrometry determination of herbicide residues in onion. *Food Chem.* **108**, 322–328 (2008).
289. Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C. M., Miguel, M. & Flores, P. Multiresidue method for analysis of pesticides in pepper and tomato by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. *Food Chem.* **105**, 711–719 (2007).
290. Ravelo-Pérez, L. M., Hernández-Borges, J., Asensio-Ramos, M. & Rodríguez-Delgado, M. Á. Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7336–7345 (2009).
291. Mou, R.-X., Chen, M.-X., Cao, Z.-Y. & Zhu, Z.-W. Simultaneous determination of triazine herbicides in rice by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **706**, 149–156 (2011).
292. Ángeles García, M., Santaefemia, M. & Julia Melgar, M. Triazine residues in raw milk and infant formulas from spanish northwest, by a diphasic dialysis extraction. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 503–510 (2012).
293. Lee, S. W. *et al.* Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 4366–4377 (2011).
294. SANCO/12571/2013 (2011). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
295. Minguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J. & Gallardo-Guerrero, L. Pigments present in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 192–196 (1990).
296. Minguez-Mosquera, M. I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., SanchezGomez, A. H. & Garrido-Fernandez, J. Color-pigment correlation in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 332–336 (1991).
297. Papaseit, J. El color del aceite de oliva extra virgen, característica de calidad. *Grasas y Aceites* **37**, 204–206 (1986).
298. Vazquez-Roncero, M. L. Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* **24**, 350–355 (1973).

299. Bianchi, G. Lipids and phenols in table olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 229–242 (2003).
300. Fernández-Hernández, A. Martínez, A. Rivas, F. García-Mesa, J.A. Parra, A. Effect of the Solvent and the Sample Preparation on the Determination of Triterpene Compounds in Two-Phase Olive-MillWaste Samples. *J Agric Food Chem* **63**, 4269–4275 (2015).
301. B. Magnusson and U. Örnemark. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. *2nd ed, 2014* 70 (2014). doi:978-91-87461-59-0
302. Guardia Rubio, M., Ruiz Medina, A., Molina Díaz, A. & Fernández de Córdoba, M. L. Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **29**, 1578–1586 (2006).

