



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

MÁSTER EN QUÍMICA AVANZADA APLICADA

TRABAJO FIN DE MÁSTER: “Determinación de pesticidas de carácter ácido en frutas y hortalizas mediante LC-MS/MS”

AUTOR: Laura Ponce Robles

TUTORES: Amadeo Rodríguez Fernández-Alba y María Dolores Gil García

JUNIO 2012

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	OBJETIVOS	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1	COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO	3
2.1.1	FITORREGULADORES	3
2.1.2	HERBICIDAS DE CARÁCTER ÁCIDO	7
2.2	GRUPOS DE ALIMENTOS DE INTERÉS Y LMR. MATRICES VEGETALES OBJETO DE ESTUDIO	16
3	TÉCNICAS DE ANÁLISIS	20
3.1	MÉTODO DE EXTRACCIÓN QuEChERS.	20
3.2	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS) ..	22
3.2.1	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	23
3.2.2	INTERFASES EN LC-MS.....	23
3.2.3	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	25
4	PLAN DE TRABAJO	28
5	EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1	REACTIVOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS	29
5.1.1	REACTIVOS UTILIZADOS	29
5.1.2	PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO	29
5.1.3	PREPARACIÓN DE EXTRACTO BLANCO MATRIZ.....	32
5.1.4	PREPARACIÓN DE LOS PATRONES DE CALIBRADO.....	32
5.1.5	PREPARACIÓN DE MUESTRAS FORTIFICADAS	33
5.2	MÉTODOS DE ANÁLISIS	33
5.2.1	EXTRACCIÓN MEDIANTE QuEChERS.....	33
5.2.2	ANÁLISIS MEDIANTE UPLC/MS-MS.....	34
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN: COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN CON AGITAX Y POLYTRON	35
6.2	OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE UPLC/MS-MS.....	37
7	VALIDACIÓN.....	42
7.1	SELECCIÓN DE MATRICES REPRESENTATIVAS	42
7.2	EFFECTO MATRIZ	42
7.3	LINEALIDAD	48
7.4	SENSIBILIDAD DEL MÉTODO	48
7.5	EXACTITUD	50
7.6	PRECISIÓN	51
7.7	LODs Y LOQs	54
8	CONCLUSIONES	55
9	COMPETENCIAS ADQUIRIDAS	57
10	BIBIOGRAFÍA CONSULTADA.....	58

1 OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo Fin de Máster es el desarrollo de un método específico para la determinación de un grupo de herbicidas que presentan propiedades ácidas y que requieren de un proceso de extracción diferente al utilizado en los métodos convencionales de análisis multiresiduo. Dentro de este método específico se han incorporado un grupo de fitorreguladores, que presentan las mismas propiedades, permitiendo el análisis simultáneo de ambos tipos de compuestos. El método puesto a punto se ha aplicado al análisis de estos compuestos en frutas y hortalizas.

Las actividades a realizar implicarán la optimización de las condiciones instrumentales adecuadas para la determinación de estos compuestos a bajas concentraciones, así como el desarrollo del método de extracción en diferentes matrices vegetales. La extracción de los analitos objeto de este estudio se llevará a cabo mediante el método QuEChERS y la monitorización se realizará mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

La finalidad del procedimiento será la validación del método utilizando pepino como matriz representativa de frutas y hortalizas con alto contenido en agua y naranja como matriz representativa de frutas y hortalizas con elevada naturaleza ácida.

2 INTRODUCCIÓN

Desde 1950 la producción agrícola ha ido aumentando continuamente debido al desarrollo de nuevas variedades de cultivo de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y pesticidas. Los beneficios alcanzados con estas mejoras agrícolas son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños medioambientales generados, incluyendo la erosión del suelo, la salinización y el anegamiento de suelos muy irrigados, el agotamiento de acuíferos, deforestación, y posibles peligros para la salud humana por el consumo de productos que pueden contener contenidos significativos de dichos pesticidas. [1]

La denominación de pesticidas o plaguicidas, incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y propiedades a pesar de su utilización común. Según el Codex Alimentarius (Comisión creada en 1963 por la Food and Agricultural Organization, FAO, y la Organización Mundial de la Salud, OMS o WHO, World Health Organization, pertenecientes a la ONU), se entiende por plaguicida o pesticida, “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye a los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales. [2]

Actualmente se utilizan cada año en Europa toneladas de pesticidas. Muchos de ellos presentan una alta toxicidad así como una gran persistencia y movilidad medioambiental, lo que los convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes, habiéndose detectado residuos de pesticidas en alimentos, aguas, suelos, fluidos biológicos, etc. [3]

La peligrosidad de estos compuestos presenta varios aspectos: peligrosidad en su fabricación y formulación, peligrosidad para el agricultor que entra en contacto con ellos, peligrosidad ecológica asociada a desequilibrios en el medioambiente y peligrosidad para el consumidor. A pesar de todos los inconvenientes que plantean, difícilmente se puede prescindir de su uso en el estado actual de desarrollo de nuestra agricultura. No obstante, el riesgo que plantea su aplicación puede verse reducido considerablemente si se aplican

correctamente a los cultivos para los que han sido elaborados, siguiendo las correspondientes medidas de seguridad, aplicando las dosis adecuadas y, además, respetando los correspondientes días de descanso (o plazos de seguridad). Pero estas premisas muchas veces no se cumplen y, si no hay control alguno que lo impida, el alimento llega al consumidor con unos niveles de pesticidas superiores a los que debería contener.

La ciencia de los pesticidas es un campo muy dinámico en el que continuamente se desarrollan nuevos compuestos con el fin de combatir nuevas plagas. Además, la creciente preocupación por los riesgos toxicológicos de los pesticidas obliga a desarrollar productos de menor persistencia y toxicidad y fácilmente desagradables en el medioambiente. Por este motivo, las metodologías analíticas deben estar en continua evolución con el fin de adaptarse a la situación actual en cuanto al uso de pesticidas modernos.

Desde el punto de vista del problema analítico, la dificultad en el análisis de los plaguicidas viene condicionada por la variedad de estructuras y propiedades físico-químicas existentes en estos compuestos, así como la complejidad de algunas matrices y los bajos niveles permitidos por la legislación, que suelen estar en el orden de los $\mu\text{g}/\text{kg}$ (niveles traza). El control de estos productos se suele realizar sobre el plaguicida inalterado, pero en ciertos casos se consideran también los productos de transformación que derivan de estas materias activas. Además ciertos productos fitosanitarios tienen unas peculiaridades características que dificultan su análisis, como puede ser el bajo peso molecular y la alta polaridad (carácter iónico).

La principal tarea de la disciplina analítica “análisis de residuos de pesticidas” (ARP), es proporcionar métodos fiables, rápidos y económicos para la identificación y cuantificación de dichos pesticidas.

2.1 COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO

En este trabajo se ha desarrollado un método específico para el estudio de un grupo de herbicidas y un grupo de fitorreguladores que presentan propiedades ácidas y que requieren de un proceso de extracción diferente al utilizado en los métodos convencionales.

2.1.1 FITORREGULADORES

Un fitorregulador es un producto que permite controlar el crecimiento de las plantas, y cuyas principales funciones son la de estimular o paralizar el desarrollo de las raíces y de las partes aéreas de la planta.

Normalmente se trata de hormonas vegetales (fitohormonas), siendo compuestos orgánicos que presentan traslocación de un órgano a otro de la planta, donde, a muy bajas concentraciones, provocan una respuesta fisiológica. Controlan un gran número de etapas, entre ellas el crecimiento de las plantas, incluyendo sus raíces, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. [4]

Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas: las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico. Todas ellas actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta.

Los fitorreguladores o fitohormonas que se van a estudiar en este trabajo son las siguientes [5]:

ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO:

Es la principal hormona natural presente en plantas grandes. Es un regulador del crecimiento de plantas que actúa sobre la elongación y división celular. Se utiliza para estimular el enraizamiento de esquejes de plantas herbáceas y ornamentales leñosas.

ÁCIDO INDOLBUTÍRICO:

Históricamente, la capacidad del ácido indolbutírico y de sus ésteres sencillos para estimular la formación de raíces en esquejes fue descrita por P. W. Zimmerman y F. Wicoxon en 1935 y por P. W. Zimmerman y A. E. Hitchcock. Fue introducido posteriormente por Union Carbide Corp. y por May y Baker Ltd.

Al igual que el ácido indolacético, es un regulador de crecimiento de plantas que actúa sobre la elongación y división celular. Se utiliza para estimular el enraizamiento de esquejes de plantas herbáceas y ornamentales leñosas.

ÁCIDO GIBERÉLICO:

El ácido giberélico es una fitohormona presente en plantas. Históricamente en 1926, E. Kurosawa descubrió un compuesto producido por fermentación de hongos *Gibberella fujikuroi*, que lo denominó giberelina A. Posteriormente la Planta de Protección ICI (ahora llamada Syngenta AG) descubrió un compuesto con propiedades biológicas y estructura química similares que denominaron ácido giberélico.

El ácido giberélico actúa como un regulador del crecimiento de las plantas a causa de sus efectos fisiológicos y morfológicos en concentraciones extremadamente bajas. Generalmente afecta sólo a las partes de la planta por encima de la superficie del suelo.

Tiene una gran variedad de aplicaciones, como por ejemplo mejorar el cuajado de las clementinas y peras; aumentar el tamaño de las uvas; controlar la maduración de la fruta retrasando el desarrollo del color amarillo de los limones; retardar el envejecimiento de la corteza de las naranjas; contrarrestar efectos de enfermedades en cerezas; producir el crecimiento uniforme de arroz; promover el alargamiento de la cosecha de invierno; inducir la floración uniforme y aumentar la producción de semillas de lechuga, estimular la floración de patatas; extender la temporada de cosecha; acelerar la madurez en alcachofas, etc.

ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO

El ácido 1-naftilacético es una sustancia que regula el crecimiento y actividad de las plantas. Fue estudiada por F.E. Gardiner y colaboradores en 1939 e introducida por Amchem Products y por la Planta de Protección ICI.

El ácido 1- naftilacético promueve la elongación y la formación de raíces, y actúa como un inhibidor del crecimiento en concentraciones elevadas.

En general se usa para estimular la formación de raíces en plantas leñosas y enredaderas; evitar el desgaste prematuro de flores y caída de frutos en las manzanas, peras, uvas, guayabas, mangos, sandías, papayas, cítricos, berenjenas, pepinos, algodón, habas de soja, etc; para mejorar el entorno, como una fuente de adelgazamiento en manzanas, peras, aceitunas, cítricos, etc, e inducir la floración en piñas.

ÁCIDO 2-NAFTILOXIACÉTICO

Históricamente, S.C. Beausor en 1939 describió el efecto del ácido 2-naftiloxiacético en el cuajado de la fruta. El compuesto fue introducido posteriormente por Synchemicals Ltd.

Es un regulador del crecimiento de la planta y se absorbe por las hojas y raíces. Se utiliza en la forma de spray en tomates, fresas, moras, pimientos, berenjenas, uvas y piñas.

4-CPA

El ácido 4-fenoxiacético es una fitohormona que regula el crecimiento de plantas. Fue introducida por Dow Chemical Co.

Se usa para mejorar el cuajado del fruto en tomate e inhibir la formación de brotes de frijol. También se utiliza para el adelgazamiento de melocotones.

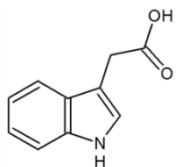
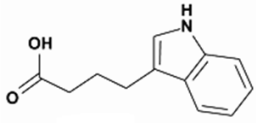
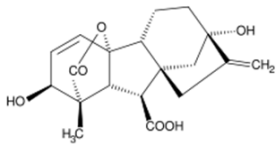
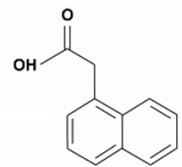
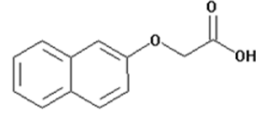
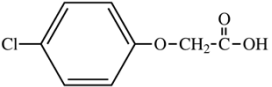
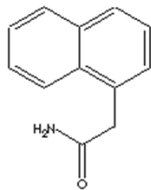
1-NAFTILACETAMIDA

Históricamente fue introducido como agente de adelgazamiento para manzanas y peras por Amchem Products, Inc.

Actúa induciendo la formación de una zona de abscisión en el pedúnculo. Se usa para el adelgazamiento de diferentes variedades de manzanas y peras, y previene la caída prematura de la fruta en manzanos y cerezos.

Las estructuras químicas de los fitorreguladores descritos anteriormente se pueden observar en la tabla 1.

TABLA 1: Fórmula molecular, estructura química, solubilidad y pKa de los fitorreguladores objeto de estudio

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura	Solubilidad en agua (mg/l)	pKa (25°C)
Ácido 3-indolacético	$C_6H_9NO_2$		1500 (20°C)	4.75
Ácido indolbutírico	$C_{12}H_{13}NO_2$		250 (20°C)	4.7
Ácido giberélico	$C_{19}H_{22}O_6$		5000 (25°C)	4
Ácido 1-naftilacético	$C_{12}H_{10}O_2$		420 (20°C)	4.23
Ácido 2-naftiloxiacético	$C_{12}H_{10}O_3$		203 (20°C)	3.55
4-CPA	$C_8H_7ClO_3$		957 (20°C)	3.01
1-Naftilacetamida	$C_{12}H_{11}NO$		170 (20°C)	0.41

2.1.2 HERBICIDAS DE CARÁCTER ÁCIDO

Etimológicamente la palabra herbicida se compone de dos vocablos; “herbi” que significa hierba y “cida”, que significa matar. En general los herbicidas son compuestos químicos que se utilizan para la eliminación selectiva de hierbas y otras plantas indeseables y es que, desde los orígenes de la agricultura, las malas hierbas han constituido un problema importante en la producción de cultivos, por lo que el hombre se ha visto en la necesidad de combatirlos primero mecánicamente y más tarde mediante el empleo de productos químicos.[6]

Las malas hierbas limitan la producción agrícola, repercuten considerablemente sobre su economía y hacen necesaria la utilización de herbicidas selectivos y de gran eficacia, que destruyan las malas hierbas sin afectar a los cultivos, que puedan utilizarse en dosis muy pequeñas para conseguir una aplicación más económica, que persistan en el medio el tiempo justo para conseguir una elevada tasa de eliminación y que no afecten al resto de organismos vivos del entorno. No obstante, el empleo de herbicidas origina diversos problemas derivados de su inespecificidad, del sobretratamiento de los cultivos, de su persistencia y de su síntesis y/o degradación, que puede generar especies más tóxicas.

Las sales inorgánicas, tales como sulfato de cobre, se usaron para el control de malezas de hoja ancha en cereales hacia finales del siglo XIX, pero el primer herbicida orgánico, DNOC (Dinitro-ortocresol), no fue introducido hasta 1932. El uso extensivo de herbicidas en dosis relativamente bajas comenzó en 1945 con el lanzamiento de los herbicidas reguladores de crecimiento 2,4-D y MCPA. El éxito de éstos condujo a una intensificación de la investigación y las inversiones, lo cual, a su vez, produjo nuevos grupos de herbicidas y compuestos en desarrollo. [7]

Actualmente, la clasificación de los herbicidas se puede hacer en función de diferentes criterios como su campo de acción, grado de penetración, estabilidad, toxicidad, semejanza química, etc. La clasificación de herbicidas según su estructura química es la más utilizada.

Los herbicidas de carácter ácido que se van a estudiar en este trabajo son los siguientes: [5]

2,4-D

Históricamente, los potentes efectos de las sales del ácido 2,4-diclorofenoxiacético fueron descritas en 1942 por P.W. Zimmerman y A. E. Hitchcock, y se descubrió en la hormona Weedkillers.

El 2,4-D es una auxina sintética que actúa como un herbicida sistémico selectivo (similar al ácido indolacético). Sus sales son fácilmente adsorbidas por las raíces de las plantas mientras que los ésteres se adsorben por el follaje, actuando como inhibidor del crecimiento.

Se utiliza como un compuesto de control anual post-emergencia en cereales, maíz, sorgo, césped, gramíneas y árboles frutales (frutas de pepita y frutas de hueso), arándanos, espárragos, caña de azúcar, arroz, etc. El éster isopropílico de dicho compuesto también se puede utilizar para evitar la caída prematura de fruta en cítricos.

Es un elemento fitotóxico para la mayoría de los cultivos de hoja ancha, tomates, plantas ornamentales, árboles frutales, remolacha, etc.

2,4-DB

Históricamente, las propiedades del ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico fueron descritas por M.E. Synerholm y P.W. Zimmerman en 1947. Fue introducido como herbicida por May y Beker Ltd.

El 2,4-DB es una auxina sintética (que actúa como el ácido indolacético). Es más selectiva que 2,4-D porque su actividad depende de la β -oxidación del 2,4-D en la planta. Actúa como una hormona de tipo herbicida de forma selectiva y sistémica y es adsorbida a través del follaje mediante translocación.

Se utiliza como un compuesto de control anual post-emergencia en las hierbas de hoja ancha como alfalfa, tréboles, cereales intercalados, pastizales, leguminosas, semillas de soja, etc.

2,4,5-T

El ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético se obtiene mediante la condensación de cloroacetato de sodio con 2,4,5-triclorofenóxido. A altas temperaturas la acción de los álcalis en el 2,4,5-triclorofenol puede producir 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina.

Bioquímicamente es similar al 2,4-D, siendo un herbicida sistémico selectivo con una hormona de acción. Se absorbe a través de las raíces, corteza y follaje y se transloca a través del floema.

Se utiliza para el control de malezas leñosas, arbustos y maleza en pastizales y tierras no cultivadas. Se utiliza además para el control de los brotes de los árboles y la maleza en el sector forestal. En forma de amina se utilizan para el control de malezas en arroz.

Es un compuesto fitotóxico para casi todos los cultivos de hoja ancha, sobre todo en algodón, tomate, plantas ornamentales, uva, y árboles frutales.

BENTAZONA

Este herbicida fue descubierto por A. Fischer en 1968 e introducido por BASF AG en 1972.

Bioquímicamente la bentazona es un inhibidor de transporte electrónico fotosintético, que es absorbido principalmente por el follaje, con muy poca translocación, pero también es absorbido por las raíces con translocación en el xilema.

Se usa como herbicida de contacto controlando las especies *Anthemis*, *Chamomilla* y *Matricaria* spp, *Chrysanthemum segetum*, *Galium aparine*, *Lapsana communis* y *Stellaria media* en cereales de primavera e invierno. También actúa sobre otros cultivos como maíz, guisantes, frijoles, arroz y soja.

BROMOXYNIL

Las propiedades del bromoxynil se describieron independientemente por R.L. Wain (1963), K. Carpenter y B. J. Heywood y Amchem Products. Dichas propiedades fueron revisadas por B. J. Heywood en 1966. El bromoxynil fue introducido posteriormente por May y Baker Ltd y por Amchem Products Inc.

Bioquímicamente, el bromoxynil es un inhibidor de transporte de electrones fotosintético en el sitio de recepción del fotosistema II y también actúa desacoplando la fosforilación oxidativa. Es un herbicida de contacto selectivo con actividad sistémica que se absorbe a través del follaje, teniendo translocación limitada.

Se utiliza como un compuesto de control anual de malezas en cereales, cultivos de semillas, césped, sorgo, etc. A menudo se utiliza en combinación con otros herbicidas para ampliar el control de plagas.

DICAMBA

Históricamente fue descrito por R.A. Darrow y R.H. Haas en 1961. Fue introducido por Velsicol Chemical Corp, y después comercializado y fabricado por Sandoz AG. Actualmente es comercializado por BASF en USA y Canadá, mientras que en el resto de países se comercializa por Syngenta.

Bioquímicamente, es una auxina sintética (que actúa como el ácido indolacético). Es un herbicida selectivo sistémico que actúa como un regulador del crecimiento y es adsorbido por las hojas y raíces con translocación en toda la planta.

Se utiliza como un compuesto de control anual de plantas de hoja ancha y malezas en cereales, maíz, sorgo, caña de azúcar, espárragos, césped, pastos, praderas, etc. Se usa en

combinación con muchos otros herbicidas y la dosis varía según el uso específico. La mayoría de las legumbres son sensibles a este herbicida.

DICLOPROP

Aunque sus propiedades de crecimiento reguladoras fueran conocidas con anterioridad, no se introdujo como herbicida comercialmente hasta 1961 por The Boots Co. Ltd.

Bioquímicamente es una auxina sintética (que actúa como el ácido indolacético). Es una hormona de tipo herbicida que actúa selectiva y sistémicamente como regulador del crecimiento e inhibe la formación de la zona de abscisión. Se adsorbe a través de las hojas con translocación hacia las raíces.

Se usa como un compuesto de control anual de hierbas de hoja ancha en cereales y praderas, permitiendo el control de malezas en los cultivos y plantas acuáticas. También se utiliza para prevenir la caída de la fruta prematura, sobre todo en manzanas. Puede utilizarse sólo o en combinación con otros herbicidas.

FENOPROP

Es un regulador del crecimiento de plantas. Sus sales fueron descritas por M.E. Synerholm y P.W Zimmerman en 1945. Sus ésteres fueron introducidos como herbicidas por Dow Chemical Co. y sus sales como reguladores de crecimiento por Amchem Products Inc.

Es un herbicida selectivo sistémico que se absorbe principalmente por las hojas. Se utiliza para el control de malezas, control de malas hierbas acuáticas, control de malezas de hoja ancha en maíz y caña de azúcar. Los aerosoles de sales de este compuesto se utilizan antes de la cosecha para reducir la caída de manzanas antes de la recolección.

FENOXAPROP

El fenoxaprop es un inhibidor en la síntesis de ácidos grasos, mediante la inhibición de la carboxilasa CoA. Es un herbicida selectivo con acción sistémica que se absorbe principalmente a través de las hojas, con translocación tanto del ápice de la hoja hasta la base de la planta y viceversa.

Se utiliza como un compuesto post-emergencia de control de malezas en semillas de soja, algodón, remolacha azucarera, hortalizas y otros cultivos de hoja ancha.

FLUAZIFOP Y FLUAZIFOP-BUTIL

Las propiedades herbicidas de estos compuestos fueron descritas por R. E. Plowman y colaboradores en 1980. Dichos compuestos fueron descubiertos por Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd. Se desarrollaron conjuntamente con ICI Plant Protection División y se comercializaron por primera vez en 1983.

Bioquímicamente el fluazifop-butil es un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos mediante la inhibición de la carboxilasa del acetil CoA, siendo un herbicida sistémico selectivo. Se hidroliza hacia la forma fluazifop y en dicha forma se produce la translocación en el xilema y floema.

Se utiliza como un herbicida post-emergencia que actúa en el control de malezas en cultivos de hoja ancha. Los usos particulares incluyen el control de cereales, remolacha azucarera, algodón, soja, frutas de pepita, viñas, cítricos, piña, plátano, fresa, girasol, alfalfa, café, plantas ornamentales y muchas verduras. En general no es fitotóxico para cultivos de hoja ancha.

FLUROXYPYR

Históricamente el fluroxypyr es un herbicida que fue descrito por O. Visbecq y colaboradores en 1983.

Bioquímicamente es una auxina sintética (que actúa como el ácido indolacético). Generalmente se aplica en la forma fluroxypyr-metil y después de la absorción predominantemente foliar, el éster se hidroliza a su ácido correspondiente, que es la forma activa herbicidamente y se traslada rápidamente a otras partes de las plantas. Actúa induciendo la respuesta de tipo auxina, como por ejemplo la deformación de las hojas.

El fluroxypyr actúa como un herbicida post-emergencia que controla un amplio rango de malezas de hoja ancha en cultivos de grano pequeño y en pastos. Sirve para realizar aplicaciones dirigidas en contra de las malas hierbas en cultivos de manzana y cultivos de plantación. No es fitotóxico para cultivos, por lo que se recomienda su uso.

HALOXYFOP Y DERIVADOS (HALOXYFOP-METIL Y HALOXYFOP-2-ETOXIETIL)

Los ésteres metil y 2-etoxietil del haloxyfop fueron introducidos como herbicidas por Dow Chemical Co. El haloxyfop-etoxietil fue comercializado por primera vez en 1985.

Bioquímicamente, tanto el haloxyfop-metil como el haloxyfop-etoxietil son inhibidores de la síntesis de ácidos grasos mediante la inhibición de la formación de la carboxilasa del Acetil CoA. Ambos compuestos son herbicidas selectivos, que se absorbe a través del follaje y

en las raíces y se hidrolizan a haloxyfop que se transloca hacia los tejidos meristemáticos inhibiendo su crecimiento.

El haloxyfop-etoxietil y el haloxyfop-metil se usan como herbicidas post-emergencia de control anual en remolacha azucarera, patatas, hortalizas de hoja, cebollas, girasol, soja, fresas y otros cultivos.

IOXYNIL

Históricamente, las propiedades herbicidas del ioxynil fueron descritas independientemente por R. L Wain en 1963, por K. Carpenter y B. JHeywood y por R.D Hart y colaboradores en 1964. Posteriormente fue introducido por May y Baker Ltd y por Amchem Products Inc.

Bioquímicamente es un inhibidor del transporte de electrones fotosintético en el lugar de recepción fotosistema II. Actúa desacoplando la fosforilación oxidativa siendo un herbicida de contacto con actividad sistémica. Se absorbe a través del follaje y tiene translocación limitada.

El ioxynil y sus sales y esteres se usan como compuestos de control post-emergencia actuando sobre una amplia gama de malezas de hoja ancha en cultivos de cebollas, puerros, ajos, caña de azúcar, césped, etc. Se usa normalmente en combinación con otros herbicidas con el fin de ampliar el control de los cultivos.

MCPA

El ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético es un regulador del crecimiento que fue descrito por R. E. Slade en 1945. Se introdujo como un herbicida por ICI Plant Protection Division y posteriormente por otras empresas.

Bioquímicamente es una auxina sintética (que actúa como el ácido indolacético). Es una hormona de tipo herbicida que actúa selectiva y sistémicamente. Se absorbe fundamentalmente por las raíces con translocación. Se concentra en regiones meristemáticas, donde inhibe el crecimiento de la planta.

Se utiliza como un herbicida de control anual de malas hierbas en cultivos de cereales, semillas, patatas, guisantes, espárragos, lino, arroz y alrededor de árboles frutales. Normalmente se utiliza en combinación con otros herbicidas. Es fitotóxico en hortalizas, algodón y plantas ornamentales.

MCPB

El ácido 4-4-cloro-o-toliloxibutírico es un herbicida descrito por R. L. Wain y F. Wightman en 1955 e introducido por May Y Baker Ltd.

En su forma MCPB-etil, bioquímicamente es una auxina sintética (que actúa como el ácido indolacético) que se utiliza en combinación con otros herbicidas como la bentazona. Es una hormona de tipo herbicida que actúa de forma selectiva y sistémica. En su forma MCPB-Na, debe su actividad bioquímica a la capacidad de translocación en plantas, oxidándose a MCPA, que es realmente tóxico.

Se utiliza como un control post-emergencia actuando sobre las malas hierbas en cultivos de cereales, guisantes, cacahuetes, etc. Ayuda a controlar las malas hierbas de hoja ancha principalmente en cultivos de arroz. Es fitotóxico en otros cultivos como los de remolacha.

MECOPROP

Históricamente, la actividad reguladora del crecimiento de plantas de este compuesto fue descrita por C. H. Fawcett y colaboradores en 1953 y su uso como herbicida fue descrito por G.B. Lush y E.L. Leafe, habiendo sido introducido por The Boots Co. Ltd, Agricultural Division.

Bioquímicamente es una auxina sintética (que actúa como el ácido indolacético). Es una hormona de tipo herbicida que actúa de forma sistémica y selectiva que es absorbido a través de las hojas y tiene translocación hacia las raíces. Solamente el isómero R-(+) tiene actividad herbicida.

Se usa como herbicida post-emergencia que controla hierbas que tienen diferentes tipos de hojas (como tréboles), que se encuentran debajo de árboles frutales, viñas, cultivos de semillas, etc.

PENTACLOROFENOL

Fue introducido en 1936 como un conservante de madera y posteriormente se utilizó como un desinfectante.

Se utiliza para controlar las termitas, y frecuentemente para proteger la madera de hongos e insectos. Su sal de sodio se usa generalmente como desinfectante, como por ejemplo se usa para las bandejas de champiñones.

PICLORAM

Es un herbicida que fue descrito por J.W. Hamaker y colaboradores en 1963. Fue comercializado por primera vez ese mismo año por Dow Chemical Co.

Bioquímicamente es un regulador de crecimiento que simula a una auxina sintética, ya que actúa como el ácido indolacético. Presenta actividad sistémica con carácter selectivo que se absorbe rápidamente a través de las raíces y hojas. Se transloca tanto del ápice de la hoja hasta la base de la planta y viceversa, acumulándose en las zonas nuevas de crecimiento.

El principal uso de las sales y ésteres de picloram es para la eliminación de la vegetación no deseada en pastizales o praderas, así como la tierra no cultivada y desechos de alrededores de instalaciones industriales y militares, carreteras, ferrocarriles, aeropuertos, etc. En algunos países existen otros usos en el arroz, la caña de azúcar y los cereales.

Se trata de un compuesto fitotóxico para la mayoría de cultivos de hoja ancha.

TRICLOPYR

El ácido 3,5,6-tricloro-2-piridoloxiacético o triclopyr es un herbicida que fue descrito por B.C Byrd y colaboradores en 1975 e introducido por Dow Chemical Co.

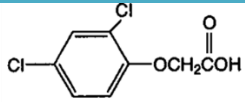
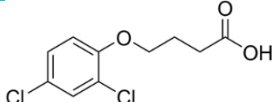
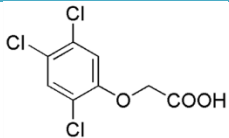
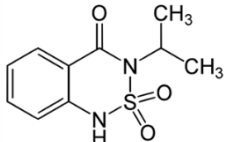
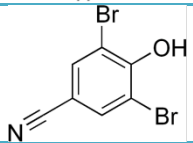
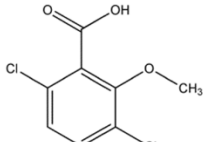
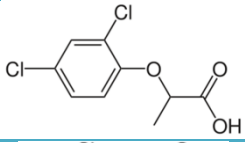
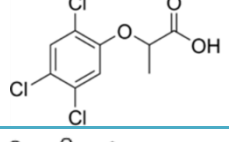
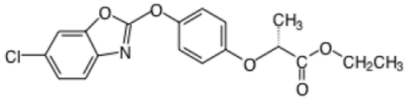
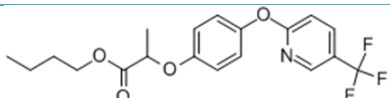
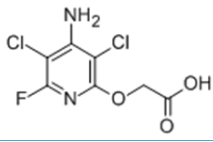
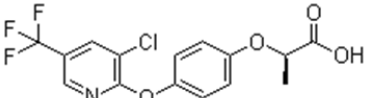
El Triclopyr-trietilamonio se registró en 1979 como un herbicida usado para terrenos no agrícolas y forestales. El Triclopyr-butotil fue registrado posteriormente en 1980.

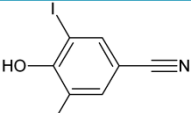
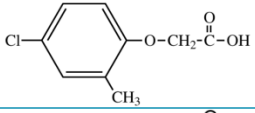
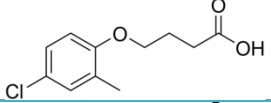
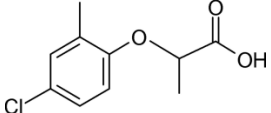
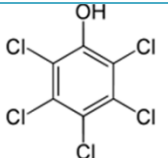
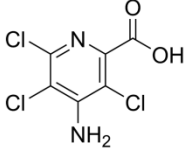
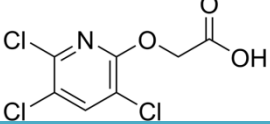
Bioquímicamente es una auxina sintética (que actúa igual que el ácido indolacético) con actividad sistémica y carácter selectivo que se absorbe rápidamente a través de las hojas y raíces, con translocación al resto de la planta y acumulación en el tejido meristemático. Induce respuestas de tipo auxina en diferentes especies (principalmente en malezas de hoja ancha).

Se utiliza como control en plantas leñosas como ortigas y zarzas, en praderas, en terrenos sin cultivar, zonas industriales, bosques de coníferas, cultivos de plantación y campos de arroz. Sin embargo, las plantas ornamentales y cultivos comestibles son sensibles a la fitotoxicidad de este compuesto.

Las estructuras químicas, así como la fórmula molecular, las solubilidades y los valores de pKa de los herbicidas de carácter ácido que se estudian en este trabajo se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2: Estructuras químicas, fórmula molecular, solubilidad en agua y valores de pKa de los herbicidas de carácter ácido estudiados

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura	Solubilidad en agua (mg/l)	pKa (25°C)
2,4-D	$C_8H_6Cl_2O_3$		311 (25°C)	2.73
2,4-DB	$C_{10}H_{10}Cl_2O_3$		46 (25°C)	4.8
2,4,5-T	$C_8H_5Cl_3O_3$		150 (25°C)	2.85
Bentazona	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$		570 (20°C)	3.3
Bromoxynil	$C_7H_3Br_2NO$		89 (25°C)	3.86
Dicamba	$C_8H_6Cl_2O_3$		6600 (25°C)	1.97
Dicloprop	$C_9H_8Cl_2O_3$		350 (20°C)	3
Fenoprop	$C_9H_7Cl_3O_3$		140 (25°C)	2.84
Fenoxaprop	$C_{18}H_{16}ClNO_5$		0.9 (25°C)	0.18
Fluazifop-butil	$C_{19}H_{20}F_3NO_4$		1 (20°C)	3.12
Fluroxypyr	$C_7H_5Cl_2FN_2O_3$		5700 (20°C)	2.94
Haloxypop	$C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$		9.08 (25°C)	4.27

Ioxynil	$C_7H_9I_2NO$		50 (20°C)	3.96
MCPA	$C_9H_9ClO_3$		395 (25°C)	3.07
MCPB	$C_{11}H_{13}ClO_3$		110 (20°C)	4.84
Mecoprop	$C_{10}H_{11}ClO_3$		880 (25°C)	3.78
Pentaclorofenol	C_6HCl_5O		215000 (20°C)	4.71
Picloram	$C_6H_3Cl_3N_2O_2$		5600 (20°C)	2.3
Triclopyr	$C_7H_4Cl_3NO_3$		408 (20°C)	3.97

2.2 GRUPOS DE ALIMENTOS DE INTERÉS Y LMR. MATRICES VEGETALES OBJETO DE ESTUDIO

“LMR” (Límite máximo para residuos de plaguicida) es la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg) recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius, para que se permita legalmente su uso en la superficie o la parte interna de productos alimenticios para consumo humano y de piensos.

Los LMR han sido establecidos en base a datos de BPA (Buenas prácticas agrícolas) y tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos LMR sean toxicológicamente aceptables.

Se establecen LMR del Codex sólo cuando se cuenta con pruebas de inocuidad, para los seres humanos, de los residuos resultantes, determinadas por la Reunión conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas, lo que significa que los Límites Máximos del Codex para Residuos representan niveles de residuos que son toxicológicamente aceptables.[8]

Por tanto la finalidad primordial de establecer LMR para residuos de plaguicidas presentes dentro o en la superficie de los alimentos es proteger la salud de los consumidores.

La Comisión Europea de Seguridad Alimentaria, en el Reglamento (CE) nº 600/2010 de 8 de Julio de 2010, establece diferentes grupos a los que se aplica un mismo límite máximo de residuos. Existen diversos grupos, pero los dos grupos que nos interesan en este trabajo son el grupo 1 (Frutas frescas o congeladas; frutos de cáscara) y el grupo 2 (verduras frescas o congeladas; frutos de cáscara), ya que los alimentos estudiados en este trabajo son frutas y hortalizas que se encuentran dentro de dichos grupos. Los alimentos que se encuentran dentro de cada grupo son los siguientes [9]:

GRUPO 1: FRUTAS FRESCAS O CONGELADAS; FRUTOS DE CÁSCARA

1. **Cítricos:** Toronjas (pamplémusa, pomelo y otros híbridos), Naranja, limón, lima, mandarina, otros
2. **Frutos de cáscara (con o sin cáscara):** Almendra, nueces, castañas, nueces de coco, avellana, piñones, pistachos, otros
3. **Frutas de pepita:** Manzana, pera, membrillo, níspero, otros
4. **Frutas de hueso:** Albaricoque, cereza, melocotones (Nectarinas y otros híbridos similares), ciruelas, otros
5. **Bayas y frutos pequeños**
 - a. Uvas de mesa y vinificación
 - b. Fresas
 - c. Frutas de caña: Mora, frambuesa, otros
 - d. Otras bayas y frutos pequeñas: Mirtillo gigante, arándanos, grosellas, escaramujo, moras, acerola, bayas de saúco, otros
6. **Otras frutas**
 - a. Piel comestible: Dátil, higo, aceitunas de mesa, kumquats, carambola, palosanto, yambolana, otros
 - b. Frutas pequeñas de piel no comestible: Kiwi, lichi, frutas de la pasión, higo chumbo, caimito, caqui de virginia, otros
 - c. Frutas grandes de piel no comestible: Aguacate, plátano, mango, papaya, granada, chirimoya, guayabo, piña, fruto del árbol del pan, diurón de las Indias Orientales, guanábana, otros.

GRUPO 2: VERDURAS FRESCAS O CONGELADAS

1. **Raíces y tubérculos**
 - a. Patatas
 - b. Raíces y tubérculos tropicales: Mandioca, boniato, batata, arrurruz,...

- c. Otras raíces y tubérculos vegetales excepto remolacha azucarera: Remolacha, zanahoria, apionabo, rábano rusticano, aguaturmas, chirivías, perejil, rábano (negro, japonés, etc), salsifíes, colinabo, nabo,...
- 2. Bulbos:** Ajo, cebolla, chalote, cebolleta, otros
- 3. Frutos y pepónides**
- a. Solanácea: Tomate, pimiento, berenjena, okra, quimbombo, otros.
 - b. Cucurbitáceas de piel comestible: Pepino, pepinillo, calabacín, otros
 - c. Cucurbitáceas de piel no comestible: Melón, calabaza, sandía, otros
 - d. Maíz dulce
 - e. Otros frutos y pepónides
- 4. Hortalizas del género brassica**
- a. Inflorescencias: Brécol, coliflor, otros
 - b. Cogollos: Coles de Bruselas, repollo, otros
 - c. Hojas: Coles de China, berzas, otros
 - d. Colirrábanos
- 5. Hortalizas de hoja y hierbas aromáticas frescas:** Lechuga y otras ensaladas, incluida Brassicacea: Canónigo, lechuga, escarola, mastuerzo, barbarea, rúcula y ruqueta, mostaza china, hojas y brotes de Brassica (hojas de guisante y de rábano y brotes tiernos de otras Brassica), otros
- a. Espinacas y similares (hojas): Espinaca, verdolaga, acelga, otros
 - b. Hojas de vid
 - c. Berros de agua
 - d. Endibias
 - e. Hierbas aromáticas: Perifollos, cebolletas, hojas de apio (Hojas de hinojo, cilantro, eneldo, alcaravea, levístico, angélica, perifollo...), perejil, salvia real, romero, tomillo, albahaca, hojas de laurel, estragón,...
- 6. Leguminosas (frescas):** Judías (con y sin vaina), guisantes (con vaina y sin vaina), lentejas,...
- 7. Tallos jóvenes (frescos):** Espárrago, cardo, apio, hinojo, alcachofa, puerro, ruibarbo, brotes de bambú, palmito, otros
- 8. Setas:** Cultivadas, silvestres, otros
- 9. Algas marinas**

Los LMR para cada compuesto de interés son diferentes dependiendo del alimento de que se trate. Los límites máximos de residuos en mg/kg de los dos grupos de alimentos descritos anteriormente se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3: LMR de los compuestos estudiados en este trabajo

COMPUESTO	LMR (mg/kg)			
	GRUPO 1	EXCEPCIONES	GRUPO 2	EXCEPCIONES
1-Naftilacetamida	0.05	Frutas de pepita: 0.1	0.05	
2,4-D	0.05	Cítricos: 0.1	0.05	
2,4-DB	0.05		0.05	
2,4,5-T	0.05		0.05	
4-CPA	0.01		0.01	
Ácido 1-Naftilacético	0.05	Manzanas y peras: 1 Membrillo y nísperos: 0.1	0.05	
Ácido 2-Naftiloxiacético	0.01		0.01	
Ácido Giberélico	5		5	
Ácido indolacético	0.01		0.01	
Ácido indolbutírico	0.01		0.01	
Bentazona	0.1		0.1	Guisantes sin vaina: 0.2 Guisantes con vaina: 0.5
Bromoxynil	0.05		0.05	
Dicamba	0.05	Manzanas: 0.1	0.05	
Dicloprop	0.05	Naranjas: 0.2	0.05	
Fenoprop	0.01		0.01	
Fenoxaprop-p	0.1		0.1	
Fluazifop y fluazifop-butil	0.2	Piña y naranja: 0.1 Membrillo, níspero, albaricoque, cereza y ciruela: 0.5	0.2	Acelga, perifollos, apio, perejil, leguminosas: 1 Col de Bruselas, chalote, ajo: 2 Endibias, algas marinas: 0.05 Melón, sandía, patata: 0.1 Repollo, raíces y tubérculos tropicales, cebolla, tomate, zanahoria, etc: 0.3 Alcachofa, apio, pimiento, perejil, tomillo, laurel, romero, estragón....: 0.5
Fluroxypyr	0.05		0.05	
Haloxifop y derivados	0.05		0.05	Patatas, zanahorias, perejil, melón, judías, guisantes, espárragos, hinojos, alcachofas y puerros: 0,1 Espinacas, acelgas y hierbas aromáticas (excepto tomillo): 0,3
Ioxinil	0.05		0.05	Zanahoria, chirivía, ajo y cebolla: 0,2 Cebolletas y puerros: 3
MCPA y MCPB	0.05		0.05	Judías sin vaina y guisantes: 0,1
Mecoprop-p	0.05		0.05	
Pentaclorofenol	0.01		0.01	
Picloram	0.01		0.01	
Triclopyr	0.1		0.1	
Quinmerac	0.1		0.1	Espinacas, acelgas y hierbas aromáticas: 0,5

3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS

El análisis de los herbicidas de carácter ácido y fitorreguladores que se presentan en los apartados anteriores mediante UPLC/MS-MS en muestras reales tiene diferentes etapas. En primer lugar se lleva a cabo la extracción mediante el método QuEChERS y posteriormente el análisis se lleva a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de masas.

3.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN QuEChERS.

La extracción es la primera etapa de la preparación de la muestra y una etapa crítica en el proceso analítico, debido a que su optimización conlleva una serie de dificultades como consecuencia de la complejidad de la matriz y la baja concentración que suelen presentar las materias activas objeto de estudio.

El objetivo de esta etapa es aislar los analitos de interés de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar la naturaleza no sólo del analito sino también de la matriz, para que la extracción sea lo más eficiente posible.

En la actualidad, hay diferentes métodos de extracción de plaguicidas en frutas y hortalizas. Muchos de ellos son complicados, laboriosos, consumen mucho tiempo y además requieren el uso de grandes cantidades de disolventes y, por tanto, son caros. Teniendo en cuenta que el tiempo empleado para el análisis instrumental también se encuentra en continuo crecimiento debido a la introducción de nuevos analitos y a las características de las técnicas instrumentales, los laboratorios no son capaces de analizar en un tiempo determinado el número de muestras que les gustaría. Además, algunos analitos no pueden ser analizados satisfactoriamente mediante los métodos convencionales, como por ejemplo compuestos básicos, ácidos o muy polares.

En la última década ha habido una tendencia general a desarrollar métodos rápidos de análisis. Idealmente, un método de extracción debe ser rápido, fácil de realizar, que requiera una cantidad mínima de productos químicos y debe proporcionar un cierto grado de selectividad para evitar procedimientos complicados de limpieza de muestra y además tiene que cubrir un espectro suficientemente amplio de analitos. Los analistas, sin embargo, a menudo dudan en cambiar a otros procedimientos más sencillos puesto que puede conducir a resultados que no sean lo suficientemente precisos.

Desde su introducción, el método QuEChERS ha sido fácilmente aceptado por muchos analistas de residuos de plaguicidas y durante su aplicación se han introducido una serie de modificaciones con respecto al método original para garantizar una extracción eficaz de los

compuestos dependientes del pH así como para minimizar la degradación de los compuestos susceptibles (por ejemplo plaguicidas en condiciones ácidas). Además se han utilizado disoluciones tamponadas para ajustar el pH a un valor de 5 a 5.5, donde la mayoría de los plaguicidas son suficientemente estables. Por otra parte, para mejorar la estabilidad de compuestos lábiles en condiciones alcalinas se acidifica ligeramente con una pequeña cantidad de ácido fórmico.

Existen algunos productos con bajo contenido en agua como cereales, frutos secos o té que requieren la adición de agua antes de la extracción para debilitar las interacciones de los plaguicidas con la matriz y, por tanto, asegurar un mejor análisis.

La palabra QuEChERS es un acrónimo de las palabras “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe”, que significan que es un método rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. [10]

El procedimiento QuEChERS conlleva una serie de sencillos pasos analíticos y, por tanto, es rápido, fácil de realizar y poco susceptible a errores. Proporciona además recuperaciones altas para una amplia gama de plaguicidas con diferentes estructuras químicas. El extracto final se redissuelve (en una disolución acuosa acidificada con ácido fórmico), dando una gran flexibilidad para la técnica de análisis ya que permite una conexión directa con la cromatografía líquida y con la cromatografía de gases.

En este estudio se ha aplicado el procedimiento QuEChERS para la extracción de residuos de plaguicidas, en concreto una serie de compuestos de carácter ácido y fitorreguladores. En primer lugar la muestra se tritura en una emulsionadora, de tal forma que tengamos una mezcla homogénea de dicha muestra. A continuación, la muestra se transfiere a una duquesa donde se lleva a cabo el proceso de extracción mediante el procedimiento QuEChERS. El procedimiento implica las siguientes etapas:

1. Pesar 10 g de muestra (de la duquesa correspondiente)
2. Adicionar 10 mL de acetonitrilo + 200 μ L de una disolución de Nicarbazin (5 mg/l)
3. Agitar vigorosamente
4. Adicionar la siguiente mezcla de sales:
 - a. 4 g \pm 2 g de sulfato de magnesio anhidro $MgSO_4$
 - b. 1 g \pm 0.05 g de cloruro sódico (NaCl)
 - c. 1 g \pm 0.05 g de citrato de trisodio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)
 - d. 0.5 g \pm 0.03 g de citrato de disodio sesquihidratado
5. Poner la mezcla en el Agytax durante 16 minutos
6. Centrifugar durante 5 min a 4500 rpm

7. **Recomposición del extracto:** Se añaden a un vial de cromatografía líquida 250µl de extracto y 750 µl de una disolución acuosa acidificada con ácido fórmico al 0.1%

Después de la centrifugación de la muestra (etapa 6) se obtienen dos fases separadas debido a la adición de cloruro de sodio y cloruro de magnesio. La adición de dichas sales induce la partición/separación de las dos fases y que el analito migre de la fase acuosa a la fase orgánica obteniéndose recuperaciones muy altas. La fase acuosa se encuentra en la parte inferior mientras que la orgánica la encontramos en la parte superior, y es en esta fase donde se encuentran por tanto los analitos de interés. Los citratos se añaden como agentes reguladores de pH.

El procedimiento QuEChERS además implica una etapa de limpieza, ya que en ocasiones en el análisis de residuos y contaminantes a niveles trazas puede haber interferentes que pueden ser co-extraídos junto con los analitos durante la extracción. En nuestro caso no ha sido necesario realizar esta etapa de limpieza ya que los extractos obtenidos están lo suficientemente limpios dando lugar a análisis libres de interferencias de matriz.

Una vez realizado el procedimiento indicado anteriormente, se procede al análisis de la muestra. Dicho análisis como se ha indicado anteriormente se realiza mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas.

3.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)

La espectrometría de masas (MS) acoplada a cromatografía líquida (LC) ha sido una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas en el campo de la química analítica aplicada al medio ambiente, alimentos y salud pública. El éxito de su aplicación es una consecuencia de la combinación de una técnica de separación (LC) que presenta una gran versatilidad y las buenas y únicas capacidades de la detección mediante MS. La MS se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad, incluso hasta niveles de pg/L, debido a su altísima especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación.

El desarrollo de esta técnica se produjo con un considerable retraso respecto a su homólogo GC-MS debido, principalmente, a la incompatibilidad de introducir los elevados flujos usados en LC convencional (1 mL/min) con el alto vacío necesario en un detector MS. Otras limitaciones que retrasaron la aplicación de esta técnica fueron la incompatibilidad del

detector MS con las fases móviles no volátiles frecuentemente utilizadas en LC y la dificultad de ionizar compuestos no volátiles. [11-13]

Una de las principales ventajas de LC-MS es su versatilidad, que permite determinar moléculas muy polares o incluso iónicas. Sin embargo, el acoplamiento LC-MS presentaba inicialmente algunas limitaciones, debido al uso de interfases a presión atmosférica (API).

3.2.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

LC es una técnica de separación física en la cual los componentes de una muestra se separan en función de su distinta afinidad entre dos fases, una fase estacionaria contenida en una columna y una fase móvil líquida, normalmente constituida por una mezcla de disolventes de distinta fuerza elutrópica, que fluye a través de la columna. El proceso cromatográfico ocurre como resultado de una repetición de etapas de absorción/desorción durante el movimiento de los analitos a través de la fase estacionaria.

3.2.2 INTERFASES EN LC-MS

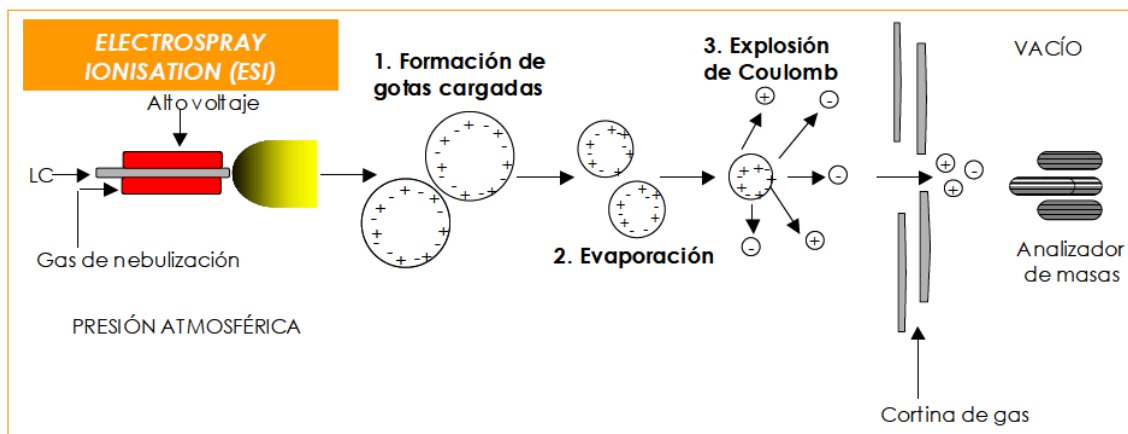
El factor limitante para el desarrollo del acoplamiento LC-MS fue el desarrollo de interfases que permitieran la introducción directa del flujo de fase móvil de LC en el detector MS.

La ionización de los analitos es de vital importancia porque es la base de la MS, ya que eligiendo la interfase adecuada podemos controlar, separar y dirigir iones cargados de forma eficiente y sencilla. Una de las interfases más utilizadas es electrospray (ESI) (ver figura 1).

Cuando se usa la interfase ESI, el flujo procedente de la LC en el cual se encuentran los analitos, pasa a través de un capilar a presión atmosférica que se mantiene a un elevado voltaje (típicamente 3-4 kV para la producción de iones positivos; ligeramente inferior y de polaridad opuesta para la producción de iones negativos). Este alto voltaje dispersa la corriente de líquido formándose gotas altamente cargadas (nebulización), que son desolvatadas a medida que pasan a través de la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas. La desolvatación es asistida por una corriente de gas caliente. A medida que disminuye el tamaño de las gotas se alcanza un punto en el cual las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie de las gotas son suficientes para superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial. Entonces ocurre una “explosión de Coulomb”, que da lugar a gotas más pequeñas, produciéndose una serie de explosiones hasta que se alcanza un punto en el cual los iones pasan a fase gas, siendo transferidos a través de una serie de lentes focalizadoras hacia el espectrómetro de masas. Puesto que la ionización tiene lugar

directamente en la disolución, las moléculas térmicamente lábiles pueden ser ionizadas sin degradación. Esta teoría se conoce como el modelo de la carga residual. [14]

Figura 1: Ionización en Electrospray



Los iones que se forman en ESI pueden ser de carga positiva o negativa y generalmente se presentan como:

- En modo positivo: iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio
- En modo negativo, iones moleculares desprotonados o aductos de formiato amónico

Algunos de los herbicidas de carácter ácido y fitoreguladores que se presentan en este trabajo se han estudiado en modo positivo y otros en negativo:

-Modo positivo: 1-Naftilacetamida, Ácido Indolacético, Ácido Indolbutírico, Fluazifop, Fluazifop-butil, Fluroxypyr, Haloxifop-metil, Haloxifop-2-etoxietil, Picloram, y Quinmerac.

-Modo negativo: 2,4,5-T, 2,4-D, 2,4-DB, 4-CPA, Ácido 1-Naftilacético, ácido 2-Naftiloxiacético, Ácido Giberélico, Bentazona, Bromoxynil, Dicamba, Dicloprop, Fenoprop, Fenoxaprop-p, Haloxifop, Ioxynil, MCPA, MCPB, Mecoprop-p, Pentaclorofenol y Triclopyr.

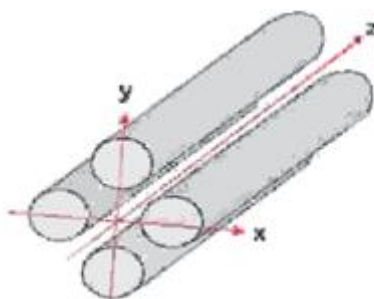
La carencia más importante que presenta en la actualidad el análisis por LC-MS mediante ESI es la imposibilidad de determinar moléculas apolares como, por ejemplo, hidrocarburos policíclicos aromáticos. No obstante, esta interfase es posiblemente la más utilizada ya que es aplicable a una gran variedad de analitos polares y térmicamente lábiles, tanto de bajo como de elevado peso molecular, y además es compatible con un amplio rango de condiciones HPLC.

3.2.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Un espectrómetro de masas es un instrumento que convierte los compuestos de una muestra en iones gaseosos y los separa en función de su relación masa/carga (m/z). Los espectrómetros de masas se pueden clasificar en función del analizador de masas usado, es decir, en función de cómo se separan los iones. Los cinco analizadores más importantes son: cuadrupolo, tiempo de vuelo, trampa de iones cuadrupolares, sector magnético y resonancia de ion-ciclotrón con transformada de Fourier.[12]

Un cuadrupolo está formado por cuatro barras alineadas paralelamente entre sí y equidistantes a una distancia r_0 de un eje central imaginario (ver figura 2).

Figura 2: Esquema de un cuadrupolo



Sobre las barras del cuadrupolo se aplican (dos a dos) voltajes de corriente continua (DC) y 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 . A un valor específico de DC y RF, sólo los iones con una particular relación m/z siguen una trayectoria estable a través de las barras y alcanzan el detector. Por tanto el cuadrupolo actúa como un filtro, ya que sólo deja pasar un número limitado de iones.

Dependiendo de la recta DC/RF podrán estabilizarse más trayectorias y por tanto podrán atravesar el cuadrupolo más iones. La resolución de los cuadrupolos está íntimamente ligada con la pendiente de esta recta, ya que a medida que aumenta la pendiente disminuye el número de trayectorias estabilizadas pudiendo separarse compuestos con m/z muy parecidas. Sin embargo, al disminuir el número de trayectorias también disminuye el número de iones que atraviesa el cuadrupolo dando lugar a una pérdida importante de sensibilidad. Como compromiso entre resolución y sensibilidad, se suele trabajar en resolución unidad, es decir, con una pendiente tal que permita separar compuestos cuya relación m/z se diferencie en 1 Da. Obteniendo de este modo una buena sensibilidad.

ANALIZADOR DE TRIPLE CUADRUPOLO (QqQ)

Cuando se desea utilizar la MS para elucidación estructural es necesaria una mayor información que la obtenida por iones generados en el proceso de ionización. Esta información adicional se puede obtener a partir de la espectrometría de masas en tándem. La posibilidad de poder acoplar dos analizadores de espectrometría de masas aumenta considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece esta técnica de LC-MS.

En el caso de instrumentos de filtro cuadrupolar, el uso de MS/MS implica necesariamente la adición de dos cuadrupolos extra a un instrumento de cuadrupolo lineal. La fragmentación se produce por colisión del ion seleccionado (ion precursor) con moléculas de gas inerte (generalmente argón). Este proceso recibe el nombre de disociación inducida por colisión (CID) y se produce en dos etapas: en la primera, la energía translacional de ion se convierte en energía interna tras colisionar con las moléculas del gas inerte; en la segunda, esta energía interna se utiliza para romper el ion en varios fragmentos (iones producto). Así, en el primer cuadrupolo se puede aislar un ion de m/z determinada que pasa al segundo cuadrupolo, usado como celda de colisión, donde tiene lugar la fragmentación de los iones al chocar contra las moléculas de gas inerte. El ion se fragmenta en función de la estructura del analito.

Cuando se trabaja en modo MS/MS se pueden realizar barridos de iones producto, barridos de iones precursores, de pérdidas neutras, o la monitorización de una transición concreta, aumentando la sensibilidad y la selectividad.

La adquisición mediante un QqQ ofrece una gran versatilidad dependiendo del modo en que opera cada uno de los dos cuadrupolos Q1 y Q2. (ver figura 3)

-Barrido de todos los iones (full scan)

En este modo de adquisición todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector. En el QqQ tanto la celda de colisión (q) como el segundo cuadrupolo Q2 no actúan en el proceso de selección, realizándose el barrido de iones con el primer cuadrupolo (Q1) y obteniendo un espectro de full scan.

-Adquisición de un ion seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM)

La adquisición SIM está dirigida a la medida de un solo ión, que es seleccionado en el primer cuadrupolo, donde la celda de colisión y el segundo cuadrupolo (Q2) no actúan en la medida. Este tipo de adquisición deriva el uso de Q simple, y su aplicación en instrumentos QqQ no suele ser muy frecuente.

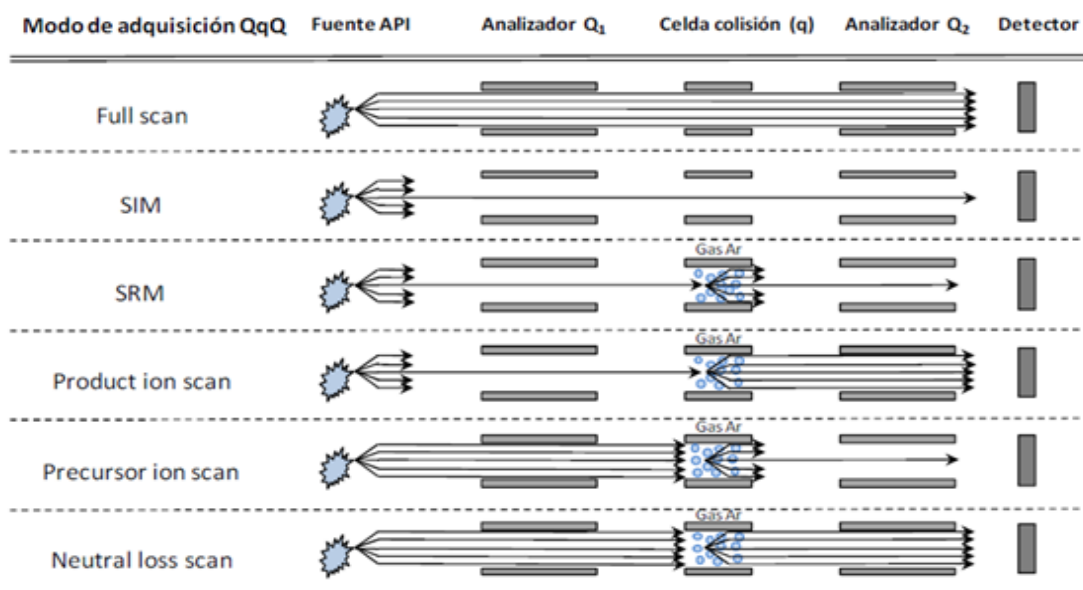
-Barrido de iones producto (Product Ion Scan)

El barrido de iones producto se lleva a cabo seleccionando en el primer cuadrupolo (Q1) una m/z concreta denominado ión precursor, que se fragmenta con una energía de colisión adecuada en la celda de colisión; el segundo analizador adquiere en modo full scan de forma que se obtiene la medida de todos los fragmentos del ion precursor. A estos fragmentos se les denomina iones producto. Este modo de adquisición es ideal para la obtención de la máxima información estructural posible del ion precursor.

-Adquisición de la reacción seleccionada (Selected Reaction Monitoring, SRM)

En el modo SRM se monitoriza una transición concreta, es decir, la fragmentación de un determinado ion precursor para dar un determinado ion producto. Así pues, el primer cuadrupolo (Q1) estabiliza una única m/z correspondiente al ion precursor; en la celda de colisión (q) se aplica una energía predeterminada para fragmentar este ion y el último cuadrupolo (Q3) sólo estabiliza una m/z que corresponde a un ion producto concreto del precursor seleccionado. De esta manera, dado que durante todo el tiempo de análisis se está midiendo una o varias transiciones específicas, se consigue una mayor sensibilidad y selectividad. La principal desventaja de este modo, es la imposibilidad de detectar otras especies presentes en la muestra que podrían resultar de interés. La adquisición en SRM es la más utilizada en las aplicaciones analíticas cuantitativas mediante QqQ, ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes y se presenta como una herramienta de alta sensibilidad y selectividad.

Figura 3 : Esquema de los modos de adquisición permitidos en un instrumento QqQ



4 PLAN DE TRABAJO

Este trabajo tiene como finalidad el análisis simultáneo de 7 fitorreguladores y 22 herbicidas ácidos en diferentes matrices en un laboratorio de rutina.

Para la realización de este trabajo fin de Máster, se han llevado a cabo las actividades que se describen a continuación.

En primer lugar se ha realizado una búsqueda bibliográfica mediante la consulta en diferentes libros de texto, artículos y páginas web con el objetivo de conocer los antecedentes y el estado actual de la determinación de plaguicidas en alimentos.

En segundo lugar se han seleccionado los compuestos objeto de estudio en base a la frecuencia y uso de dichos compuestos en diferentes matrices, teniendo en cuenta los límites máximos de residuos. También se ha consultado en la bibliografía diferentes artículos que nos muestran las técnicas más aplicadas para la determinación de los analitos seleccionados. Además, se han seleccionado las matrices objeto de estudio, con el fin de obtener resultados representativos en un gran número de matrices a partir de dos matrices representativas (pepino y naranja).

A continuación se ha llevado a cabo un estudio para la optimización del sistema UPLC/MS-MS, que se ha seleccionado para el análisis de los dos grupos de compuestos. Para ello, los compuestos se someten a una infusión individual con el fin de obtener las transiciones óptimas para cada analito. Para optimizar las condiciones de trabajo se han seleccionado las condiciones óptimas de energía de colisión y voltaje de cono y además un gradiente de fase móvil con el objetivo de que todos los analitos se separen de forma adecuada en el sistema cromatográfico mediante su elución a diferentes tiempos de retención, no quedando ninguno de ellos retenido en la columna cromatográfica.

Posteriormente se ha realizado la optimización del sistema de extracción de los analitos en diferentes matrices.

Por último se ha llevado a cabo la validación del método, mediante el cálculo de los siguientes parámetros de validación: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs).

5 EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS

5.1.1 REACTIVOS UTILIZADOS

Los patrones de los herbicidas de carácter ácido y fitorreguladores que se presentan en este trabajo han sido suministrados por la empresa Dr. Ehrenstorfer.

Los reactivos químicos que se han usado tanto para la etapa de extracción como para el análisis mediante UPLC/MS-MS son los que se muestran a continuación: Acetonitrilo (grado HPLC) $\geq 99.9\%$, metanol (grado HPLC) $\geq 99.9\%$, ácido fórmico (98%), cloruro sódico (99.5%), sulfato de magnesio anhidro extra puro (98%), citrato de trisodio dihidratado (99.5%), sal disódica de ácido cítrico sesquihidratada (99%), dihidrogenofosfato de sodio dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (99.5%), dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4 99%) y Nicarbazina (99%).

5.1.2 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO

La disolución de Nicarbazina (5ppm) se prepara disolviendo 0.0010 g de Nicarbazina en una mezcla Acetonitrilo:metanol (50:50), de tal forma que se obtiene una disolución primaria de 100 ppm. A continuación se hace una disolución secundaria pipeteando 2500 μl de la disolución primaria y posteriormente enrasando en un matraz aforado de 50 ml con metanol.

En el sistema cromatográfico se utilizan las siguientes disoluciones:

-Para las fases móviles:

-Fase orgánica: Disolución de metanol al 0.1% de ácido fórmico.

-Fase acuosa: Es una disolución de formiato amónico 2 mM en agua al 0.1% de ácido fórmico. Se prepara añadiendo a un matraz aforado de 1 litro, 0.1262 g de formiato amónico 2mM, y añadiendo agua desionizada Fluca, LC-MS CHROASOLV[®] al 0.1% de ácido fórmico.

-Disolventes de lavado:

-Strong solvent: Se utiliza 100% metanol

-Weak solvent: Se trata de una disolución con un 10% de metanol y un 90% de agua LC-MS.

Las disoluciones patrón de los analitos de interés se preparan individualmente por pesada de una cantidad determinada de cada patrón sólido y posterior disolución en el disolvente apropiado, de tal forma que tengamos todas las disoluciones a una concentración de 1000 mg/l. A estas disoluciones se les llama disoluciones primarias. En la tabla 4 se

muestran las cantidades pesadas de cada uno de los patrones y el volumen final de cada disolución, así como los disolventes elegidos para ello.

Tabla 4: Modo de preparación de las disoluciones primarias a partir de los patrones de las sustancias objeto de estudio.

Materia activa	Pureza (%)	Volumen final (ml)	Peso (g)	Dvte usado
1-Naftilacetamida	99	50	0,0505	Acetona PAI
2,4,5-T	97,5	10	0,0103	Metanol HPLC
2,4-D	99	50	0,0505	Acetona PAI
2,4-DB	99	10	0,0101	Acetona PAI
4-CPA (ac 4-clorofenoxiacético)	99	10	0,0101	Metanol HPLC
Ácido 1-Naftilacético (ANA)	98,5	10	0,0102	Acetona PAI
Ácido 2-Naftoxiacético	96,5	10	0,0104	Metanol HPLC
Ácido 4-(3-indol)-butirico	99	10	0,0101	Acetona PAI
Ácido 3-indolyl-acético	99	10	0,0101	Acetona PAI
Acido Giberélico	98	10	0,0102	Acetona PAI
Benzatona	98	10	0,0102	Acetona PAI
Bromoxynil	98,5	50	0,0508	Acetona PAI
Daminozida	97	10	0,0103	Metanol HPLC
Dicamba	98,5	10	0,0102	Acetona PAI
Dichlorprop	99,7	50	0,0502	Acetona PAI
Fenoprop (2,4,5-TP)	97,7	10	0,0102	Acetona PAI
Fenoxaprop-p	99	10	0,0101	Acetona PAI
Fluazifop		10		
Fluazifop butil	99	50	0,0505	Acetona PAI
Fluroxipir	97	10	0,0103	Acetona PAI
Haloxifop	99	50	0,0505	Acetona PAI
Haloxifop-2-ethoxyethyl	98,5	50	0,0508	Acetona PAI
Haloxifop-methyl	97	50	0,0515	Acetona PAI
Ioxinil	99,3	10	0,0101	Acetona PAI
MCPA	98,5	10	0,0102	Acetona PAI
MCPA-Thioethyl	99,5	10	0,0101	Acetona PAI
MCPB	99	10	0,0101	Acetona PAI
Mecoprop	98,7	10	0,0101	Acetona PAI
Pentaclorofenol	99,5	50	0,0503	Acetona PAI
Picloram	95	10	0,0105	Acetona PAI
Quinmerac	99	10	0,0101	Metanol HPLC

En el caso del fluazifop se utilizó un patrón líquido comercial a una concentración de 1000 mg/l por lo que no fue necesaria su preparación.

A continuación a partir de las disoluciones individuales de los analitos se preparan disoluciones más diluidas en un volumen de 50 ml con acetonitrilo. A esta disolución se le denomina disolución secundaria. Esta disolución tiene una concentración de 5 ppm excepto para el caso del ácido 1-Naftilacético y dicamba que tendrán una concentración de 10 ppm y el pentaclorofenol y la daminozida que tendrán una concentración de 20 ppm (ver tabla 5). Esto

se debe a que estos compuestos son menos sensibles y para tener unos resultados reproducibles se tienen que inyectar en mayores concentraciones.

Tabla 5: Volúmenes necesarios de las disoluciones patrón 1^{as} para la obtención de la disolución patrón 2^a.

Materia activa	Conc. disol. Patrón 2 ^a (mg/l)	Vol. Pipetear disol. Patrón 1 ^a (μ l)
Fluazifop	5	2500
Fluacifop-butil	5	250
Haloxifop	5	250
Haloxifop metil	5	250
Haloxifop 2-etoxietil	5	250
Bromoxynil	5	250
Pentaclorofenol	20	1000
Dichlorprop	5	250
2,4-D	5	250
MCPB	5	250
MCPA	5	250
Acido Giberélico	5	250
Benzatona	5	250
Mecoprop	5	250
Dicamba	10	250
Fenoprop (2,4,5-TP)	5	250
Triclopir	5	250
Ioxinil	5	250
Fluroxipir	5	250
Ácido 2-Naftoxiacético	5	250
2,4,5-T	5	250
4-CPA(ac 4-clorofenoxiacético)	5	250
2,4-DB	5	250
Quinmerac	5	250
Daminozida	20	1000
Picloram	5	250
Fenoxaprop-p	5	250
Ácido 1-Naftilacético (ANA)	10	500
1-Naftilacetamida	5	250
Diclorprop-p	5	250
Mecoprop-p	5	250
Ácido 3-indolyl-acético	5	250

Por último se preparan las disoluciones de trabajo más diluidas, llamadas MLH-1 y MLH-2. MLH-1 se prepara añadiendo a 500 μ l de disolución secundaria a un matraz aforado de 10 ml y enrasando con metanol, de tal forma que contiene una concentración de 0.25 mg/l. En el caso del ácido 1-Naftilacético y dicamba la concentración será de 0.5 mg/l y en el caso del pentaclorofenol y daminozida la concentración será de 1 mg/l. La MLH-2 se prepara añadiendo 200 μ l de la disolución secundaria a un matraz aforado de 10 ml y enrasando con metanol, de tal forma que tenemos una disolución con una concentración de 1 mg/l, excepto para el ácido

1-Naftilacético y dicamba la concentración será de 2 mg/l y para pentaclorofenol y daminozida cuya concentración será de 4 mg/l.

5.1.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTO BLANCO MATRIZ

El extracto blanco matriz es aquel que no contiene el analito de interés. Se prepara mediante el método QuEChERS que se indica en el apartado de técnicas de análisis, pero sin adicionar nicarbazina.

5.1.4 PREPARACIÓN DE LOS PATRONES DE CALIBRADO

La construcción de las rectas de calibrado se realiza a partir de disoluciones patrón de los analitos de concentración perfectamente conocida, cubriendo el rango de concentración que se espera encontrar de los mismos en las muestras a analizar en los ensayos.

Para ello, se han utilizado las disoluciones MLH-1 y MLH-2 (descritas en el apartado de preparación de disoluciones de trabajo). El procedimiento consiste en adicionar a un volumen determinado de extracto blanco de matriz, 10µl de Nicarbazina y diferentes cantidades de las disoluciones anteriores en un matraz de 2 ml. A continuación se enrasan los matraces de 2 ml con agua acidificada con un 0.1% de ácido fórmico y se transfieren a viales HPLC para su análisis cromatográfico.

En la tabla 6 se muestran los volúmenes a utilizar de cada una de las disoluciones MLH-1 y MLH-2 para la obtención de las cuatro disoluciones patrón utilizadas en el procedimiento de calibración.

Tabla 6: Preparación de la recta de calibrado

	V dis de trabajo MLH-1 (µl)	V dis. Trabajo MLH-2 (µl)	V dis patron 2ª nicarbazina	V extracto blanco matriz (µl)
P1: 0,005 mg/kg	10	-	10	500
P2: 0,025 mg/kg	50	-	10	500
P3: 0,05 mg/kg	-	25	10	500
P4: 0,10 mg/kg	-	50	10	500
Blanco	-	-	10	500

A continuación a partir de las señales obtenidas y de las concentraciones de cada uno de los cuatro patrones se ajustan los datos a una línea recta, excepto para la bentazona para la que se realiza un ajuste cuadrático.

En la tabla 7 se muestran las concentraciones de cada punto de la recta de calibrado para todos los compuestos estudiados. Se puede observar que todos los compuestos tienen la misma concentración en cada uno de los puntos de calibrado exceptuando al ácido 1-naftilacético, dicamba, pentaclorofenol y daminozida cuya concentración es superior al resto.

Tabla 7: Concentraciones de cada uno de los puntos de la recta de calibrado para los compuestos de interés.

	Excepciones		
	Concentraciones (mg/kg)	Conc. Ácido 1-Naftilacético y Dicamba (mg/kg)	Conc. de Pentaclorofenol y daminozida (mg/kg)
P1	0.005	0.01	0.02
P2	0.025	0.05	0.10
P3	0.05	0.10	0.20
P4	0.10	0.20	0.40

5.1.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS FORTIFICADAS

Para la preparación de muestras fortificadas, se pesan 10 g de matriz blanca y a continuación se fortifica añadiendo el volumen necesario de disolución de trabajo o secundaria de tal forma que la concentración resultante corresponda a un punto dentro del rango lineal definido en el alcance. La muestra se deja en reposo media hora y a continuación tiene lugar la extracción que se lleva a cabo mediante el método QuEChERS que se describe más adelante.

Las diferentes concentraciones que tienen los fortificados son las mismas que las de cada uno de los puntos de la recta de calibrado (ver tabla 7). Las cantidades de disolución que se añaden a dicha matriz son las siguientes:

Fortificado 1: Se añaden 50 µl de disolución MLH-2 a la matriz blanca

Fortificado 2: Se añaden 250 µl de disolución MLH-2 a la matriz blanca

Fortificado 3: Se añaden 500 µl de disolución MLH-2 a la matriz blanca

Fortificado 4: Se añaden 200 µl de disolución secundaria a la matriz blanca

5.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS

5.2.1 EXTRACCIÓN MEDIANTE QuEChERS

En primer lugar se realiza la homogeneización de las muestras utilizando una emulsionadora Samic SKE-8. Para la extracción de los analitos se ha seleccionado el método QuEChERS. Para ello, se pesa 10 gramos de muestra en tubos de centrifuga con una precisión de 0.1 mg (la muestra tiene que estar previamente homogeneizada). A continuación se añaden 10 ml de acetonitrilo, 200 µl de una disolución de nicarbacina 5 mg/l y una mezcla de sales (4 ±2 g de sulfato de magnesio anhidro, 1 ±0.05 g de cloruro sódico, 1 ±0.05 g de citrato de sodio dihidratado y 0.5 ± 0.03 g de citrato de sodio sesquihidratado) y se extraen los analitos mediante agitación en un sistema Agytax SR1-CP38 con un programa de un tiempo de 960 s, aceleración de 99 m/s², velocidad de 2 m/s y una amplitud de 99 mm, obteniéndose dos fases.

A continuación la muestra se centrifuga en una centrifuga Orto Alresa Digtor 21 durante 5 minutos a 4500 rpm. Por último se añade a un vial de 12x32 mm de cromatografía líquida una alícuota de 250 µl de fase orgánica y 750 µl de agua acidificada con ácido fórmico al 0.1%, obteniéndose la muestra preparada para la posterior inyección.

5.2.2 ANÁLISIS MEDIANTE UPLC/MS-MS

El análisis de los analitos se llevará a cabo mediante un sistema UPLC (Waters Acquity UPLC System) acoplado a un espectrómetro de masas Xevo TQ-MS con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) y usando electrospray (ESI) como interfase.

La separación cromatográfica se realiza utilizando una columna analítica Acquity Uplc Beh C18 (2.1 x 100 mm, 1.7µm), a una temperatura de 50°C y un flujo de 400µl/min. El volumen de inyección es de 35 µl. La fase móvil se programa utilizando un gradiente de dos fases: La fase A (fase acuosa) que contiene 2 mM de formiato amónico en agua con un 0.1% de ácido fórmico y la fase B (orgánica) que contiene metanol con un 0.1% de ácido fórmico.

Los parámetros de la espectrometría de masas son los que se muestran a continuación:

- El voltaje de capilar es de 1.5 kV
- La temperatura de la fuente de ionización es de 150°C.
- El gas de desolvatación es gas nitrógeno con un flujo de 1000 l/h y una temperatura de desolvatación de 450°C.
- El gas de cono es nitrógeno a un flujo de 50 l/h.
- El gas de colisión es argón con un flujo de 0.24 ml/min y a una presión de 5×10^{-3} mBar.

Los experimentos se han realizado con un continuo cambio de polaridad positivo/negativo de 27ms.

El voltaje de cono y la energía de colisión se han optimizado individualmente para cada compuesto de interés.

Para el tratamiento y análisis de datos se ha utilizado un sistema informático con el programa MassLynx V.4.1.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN: COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN CON AGITAX Y POLYTRON

Para la optimización del sistema de extracción se ha realizado un estudio comparativo de la extracción de los analitos basada en el método QuEChERS descrito anteriormente y realizando una ligera modificación. Dicha modificación consiste en añadir 2 mL de una disolución tamponada (108 g de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (99%) y 55g de dihidrogenofosfato de potasio K_2HPO_4 (99%) en 500 ml de agua desionizada) después de la adición de los 10 ml de acetonitrilo y 200 μl de la disolución de Nicarbazin (5 mg/l). A continuación la mezcla se homogeneiza en un polytron Ultra-Turrax durante 3 min. A 8000 rpm. Posteriormente, se adiciona sulfato de magnesio anhidro y cloruro sódico y se realiza la centrifugación. El resto del procedimiento es igual que el método QuEChERS descrito anteriormente.

El estudio comparativo de ambos métodos de extracción se realiza con muestras fortificadas de naranja y pepino a la concentración correspondiente al punto 4 de la recta de calibrado (ver tabla 7). Las recuperaciones obtenidas por ambos métodos de extracción se muestran mediante gráficos de barras (figuras 4 y 5). Puede observarse que en general se obtienen mejores recuperaciones con el método que utiliza el agitax y la adición de citratos, con recuperaciones comprendidas entre el 70-120% mientras que con el segundo procedimiento las recuperaciones son bajas para algunos de los analitos.

Figura 4: Comparación del método de extracción utilizando citratos y agitax frente al método de extracción utilizando una disolución tamponada y polytron en fortificados de pepino

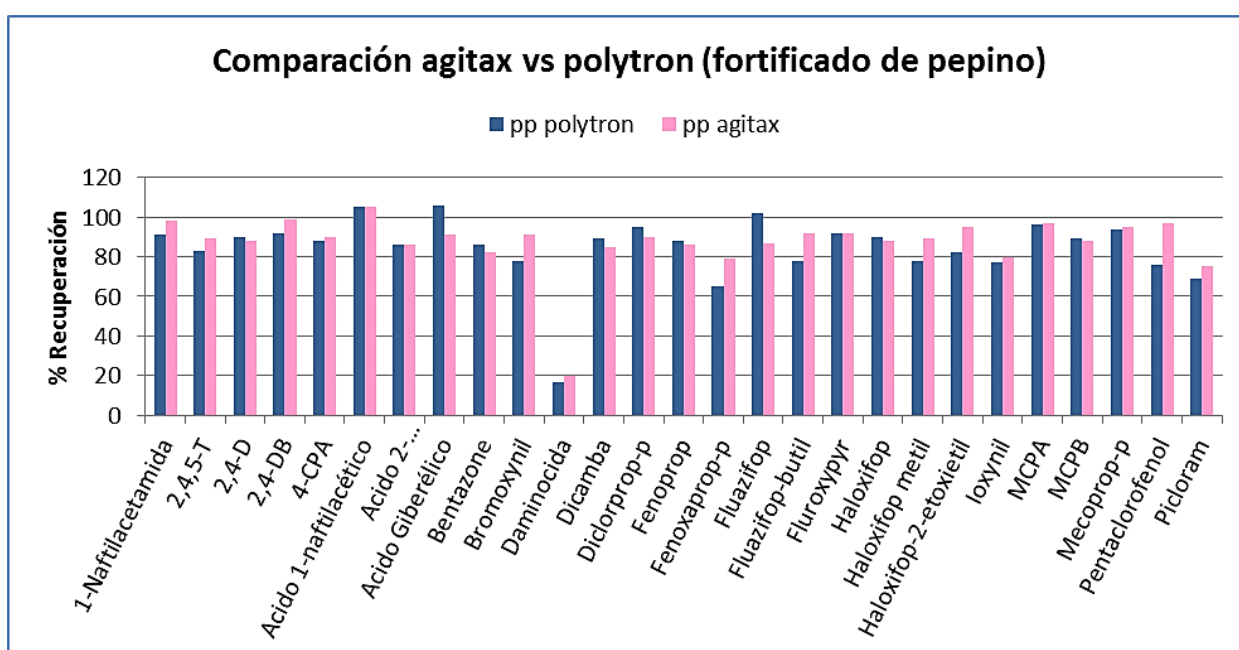
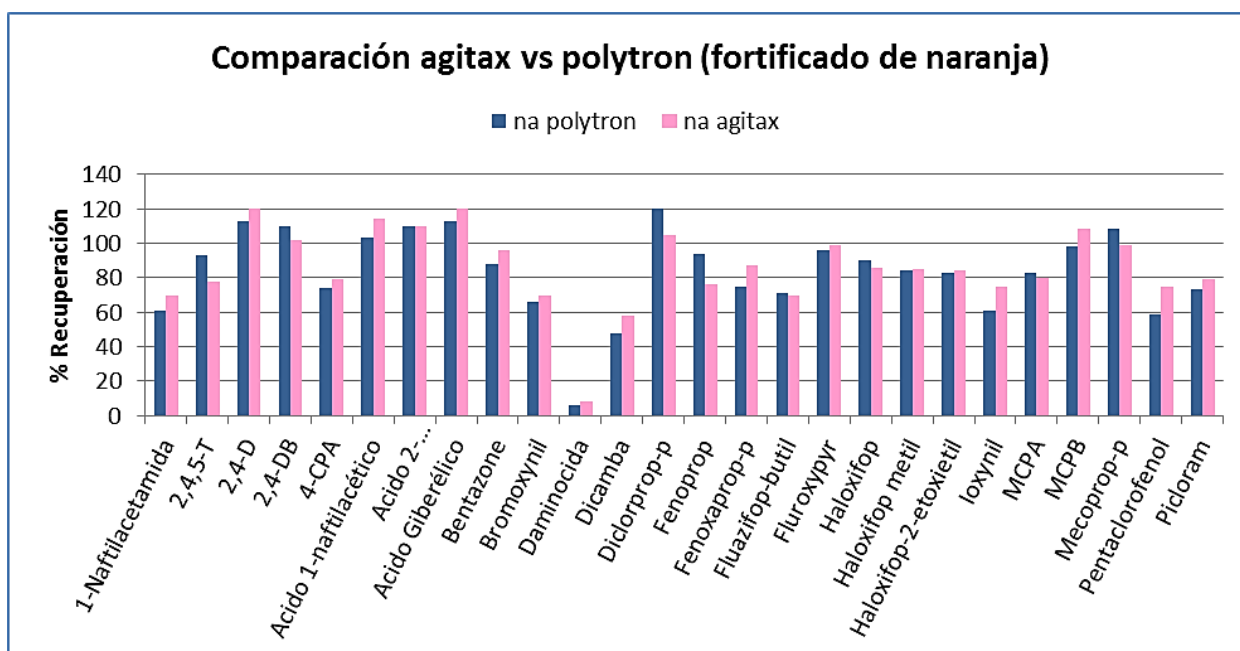


Figura 5: Comparación del método de extracción utilizando citratos y agitax frente al método de extracción utilizando una disolución tamponada y polytron en fortificados de naranja



En las figuras 4 y 5 se muestran además de forma comparativa las recuperaciones obtenidas en pepino y naranja, respectivamente. Puede observarse que se obtienen mejores recuperaciones en pepino, ya que la naranja es un alimento con alto contenido en ácido lo que da lugar a recuperaciones elevadas debido a la presencia de interferencias con alguno de los analitos estudiados.

Por otra parte, para las muestras de pepino (figura 4) se puede observar que las recuperaciones obtenidas para daminozida son muy bajas en ambos procedimientos de extracción, por tanto ninguno de los métodos es adecuado para la extracción de este compuesto en dicha matriz no siendo posible la validación de dicho analito.

En el caso de las muestras de naranja (figura 5) hay que destacar el caso de daminozida y dicamba. En ambos casos las recuperaciones obtenidas son muy bajas, por tanto no se puede validar el método para ambos analitos.

Por último, en la figura 5 (naranja) puede observarse que para fluzifop las recuperaciones obtenidas por ambos procedimientos son muy elevadas, 1076 % en el caso del procedimiento utilizando el polytron y la disolución tamponada y 1079 % en el caso de utilizar el agitax y los citratos. Estos valores tan altos son debidos a la presencia de interferencias en la señal de fluzifop y que, por tanto, impiden el análisis de este plaguicida en dicha matriz.

6.2 OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE UPLC/MS-MS

Para optimizar las condiciones MS-MS se preparan disoluciones patrón individuales de cada uno de los compuestos de carácter ácido y fitorreguladores a una concentración de 1 mg/L en una mezcla en metanol: agua (90:10) (v:v) acidificada con un 0.1% de ácido fórmico, con el fin de incorporar protones al medio. Estos compuestos se someten a una infusión individual a un flujo de 5 µl/min en el espectrómetro de masas con el fin de encontrar las transiciones más adecuadas para el análisis de cada uno de ellos. La infusión de los compuestos se realiza en modo full scan y se seleccionan las dos transiciones analíticas para las cuales se obtiene una señal más alta. La transición que nos dé una señal más alta la utilizaremos para cuantificar el analito (ión de cuantificación) y la otra transición se utilizará para confirmar que es el analito de interés (ión de confirmación), tal y como recomienda el documento SANCO. [15]

Además, para optimizar las condiciones de trabajo, para cada compuesto se seleccionan las condiciones óptimas de voltaje de cono y energía de colisión. Las transiciones de cada compuesto, así como el voltaje de cono y energía de colisión se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Voltaje de cono, energía de colisión y transiciones de cuantificación y confirmación de todos los compuestos objeto de estudio.

Nombre	Cuantificación			Confirmación			Vcono
	Padre	Hijo	EC	Padre	Hijo	EC	
1-Naftilacetamida	186	141	15	186	115	25	20
2,4,5-T	253,2	195,1	12	255,2	197,1	12	18
2,4-D	219,2	161,2	10	221,2	163,2	10	15
2,4-DB	247,3	161,2	10	249,3	163,2	10	15
4-CPA	185,2	127,3	15	187,2	129,2	15	20
Ácido 1-Naftilacético	185,2	141,3	10	NO			10
ácido 2-Naftiloxiacético	201,3	143,32	13	201,3	115,3	40	25
Ácido Giberélico	345,5	143,4	25	345,5	239,4	20	35
Ácido Indolacético	176,1	129,9	15	176,1	102,9	30	20
Ácido Indolbutírico	204,1	186	15	204,1	168	18	20
Bentazona	239,3	132,4	25	239,3	197,2	25	25
Bromoxynil	276,2	81,2	35	274,3	79,3	35	40
Dicamba	219,2	175,2	7	221,2	177,2	7	10
Diclorprop	233,2	161,2	10	235,2	163,2	10	15
Fenoprop	269,2	197,1	12	267,2	195,1	12	12
Fenoxaprop-p	332,4	260,2	13	332,4	152,3	20	25
Fluazifop	328,1	282,1	20	328,1	255,1	25	36
Fluazifop-butil	384,1	282,1	22	384,1	328,1	16	28
Fluroxypyr	254,9	208,8	16	254,9	180,8	22	18
Haloxifop	360,5	288,2	15	3962,2	290,2	15	20
Haloxifop metil	376	316,1	18	376	91,1	32	26
Haloxifop-2-etoxietil	434	316	20	434	91	34	24
Ioxynil	370,4	127,2	35	370,4	215,3	35	40

MCPA	199,2	141,2	12	201,3	143,3	12	15
MCPB	227,2	141,2	7	229,2	143,2	7	10
Mecoprop-p	213,3	141,3	13	215,3	143,3	13	25
Nicarbazin	301,6	137,3	15	301,6	107,4	40	20
Pentaclorofenol	265,2	35,47	35	263,2	35,4	35	50
Picloram	241	168	30	241	195	21	16
Qinmerac	222,2	204,2	15	222,2	141,1	30	14
Triclopyr	256,2	198,2	8	254,2	196,2	8	10

Para la separación de los analitos en el sistema LC se establece un gradiente de fase móvil a un flujo de 400 µl/min durante 19 minutos, que varía desde un 5% inicial hasta un 100% de metanol, asegurándonos que todas las moléculas eluyen independientemente de su polaridad. La fase móvil se programa utilizando un gradiente de dos fases: La fase A o fase acuosa contiene 2 mM de formiato amónico en agua más un 0.1% de ácido fórmico y la fase B u orgánica contiene metanol al 0.1% de ácido fórmico. (ver tabla 9)

Tabla 7: Gradiente de fase móvil utilizado

Tiempo (min)	Inicial	0,5	0,7	6,0	8,5	9,5	11,5	12,5	13,5	14,5	15,5	16,5	16,6	19,0
% Fase A	5	20	20	40	55	55	65	65	70	75	85	100	5	5
% Fase B	95	80	80	60	45	45	35	35	30	25	15	0	95	95

Tras la selección de las transiciones, voltaje de cono, energía de colisión y gradiente, obtenemos el tiempo de retención para cada compuesto y programamos el equipo de tal forma que hacemos diferentes funciones. En dichas funciones se agrupan los compuestos según el modo de ionización y el tiempo de retención de dichos analitos. En la figura 6 podemos observar dichas funciones, el modo de ionización y el tiempo de retención.

No se incluye ninguna función a tiempos inferiores a 1.5 minutos, ya que se observa en el cromatograma mucho ruido ni tampoco a tiempos superiores a 17.5 minutos ya a ese tiempo han eluido todos los analitos de interés y corresponde a la etapa de gradiente necesaria para volver a las condiciones iniciales, de tal forma que el equipo queda preparado para el siguiente análisis. En la tabla 10 se muestra el intervalo de tiempo en el que eluyen los analitos de interés y el modo de ionización empleado para cada compuesto.

Asimismo, en las figuras 7, 8 y 9 se muestran los cromatogramas de todos los compuestos estudiados y ordenados en función del tiempo de retención.

Figura 6: Funciones de agrupación de analitos según modo de ionización y tiempo de retención.

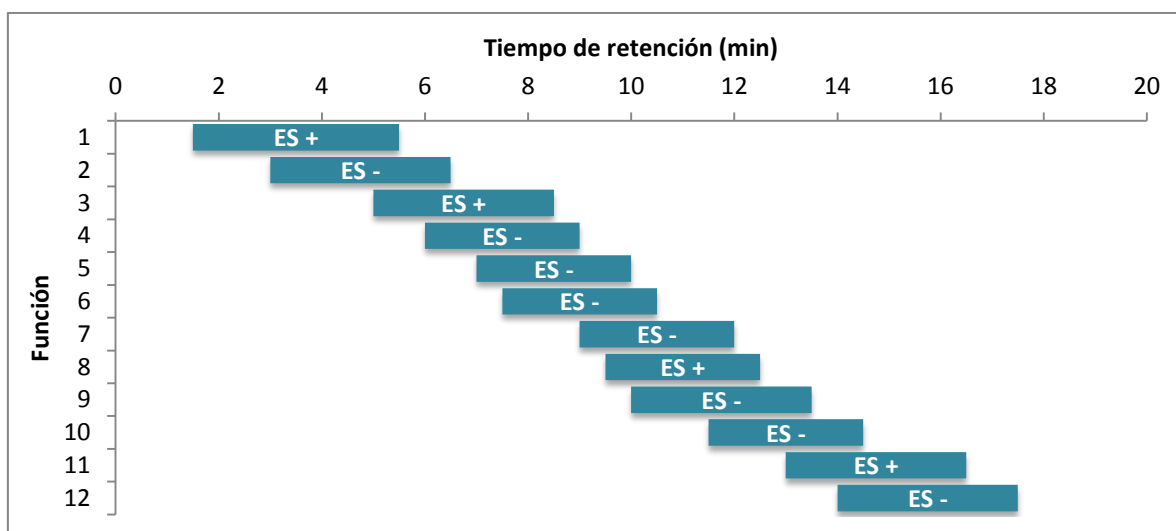


Tabla 10: Intervalos de tiempo de retención y modo de ionización de los analitos de interés.

TIEMPO RETENCIÓN (min)	MODO DE IONIZACIÓN	COMPUESTOS
1,5-5,5	ES+	Ácido Indolacético Picloram Qinmerac
3-6,5	ES-	Ácido Giberélico Dicamba
5-8,5	ES+	Ácido Indolbutírico Fluroxypyr 1-Naftilacetamida
6,0-9,0	ES-	Bentazona 4-CPA
7,0-10,0	ES-	Bromoxynil Acido 1-Naftilacético ácido 2-Naftiloxiacético
7,5-10,5	ES-	2,4-D MCPA Ioxynil
9,0-12,0	ES-	2,4,5-T Diclorprop Mecoprop-p Triclopyr
9,5-12,5	ES+	Fluazifop
10-13,5	ES-	MCPB Fenoprop 2,4-DB Nicarbazin
11,5-14,5	ES-	Haloxifop Fenoxaprop-p
13,0-16,5	ES+	Haloxifop metil Haloxifop-2-etoxietil Fluazifop-butil
14-17,5	ES-	Pentaclorofenol

Figura 7: Cromatograma de analitos según tiempo de retención.

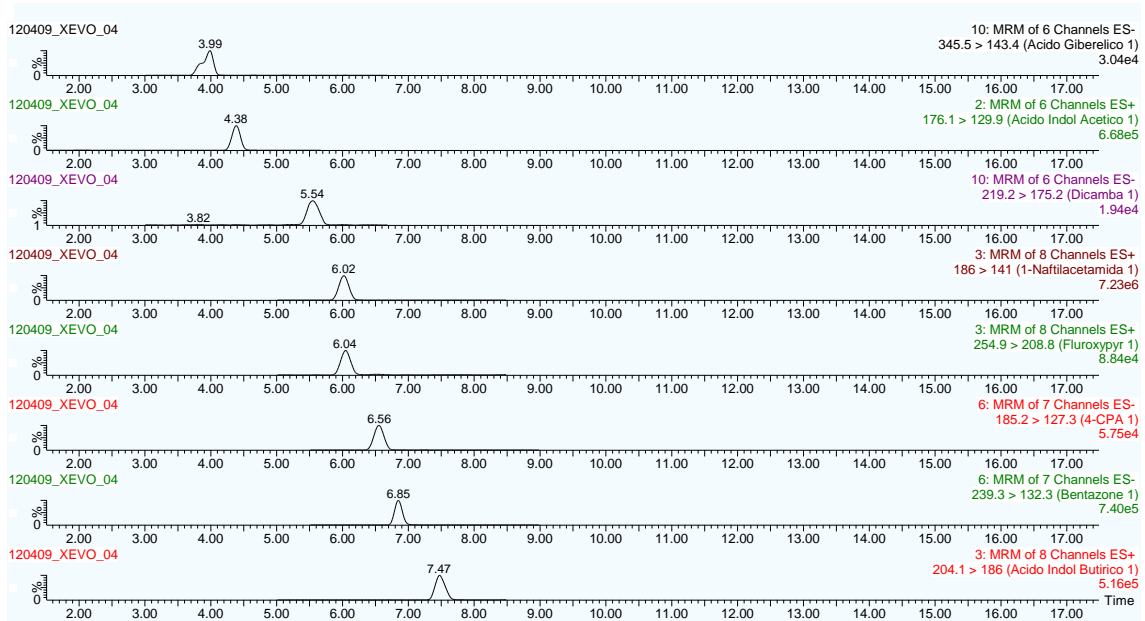


Figura 8: Cromatograma de analitos según tiempo de retención.

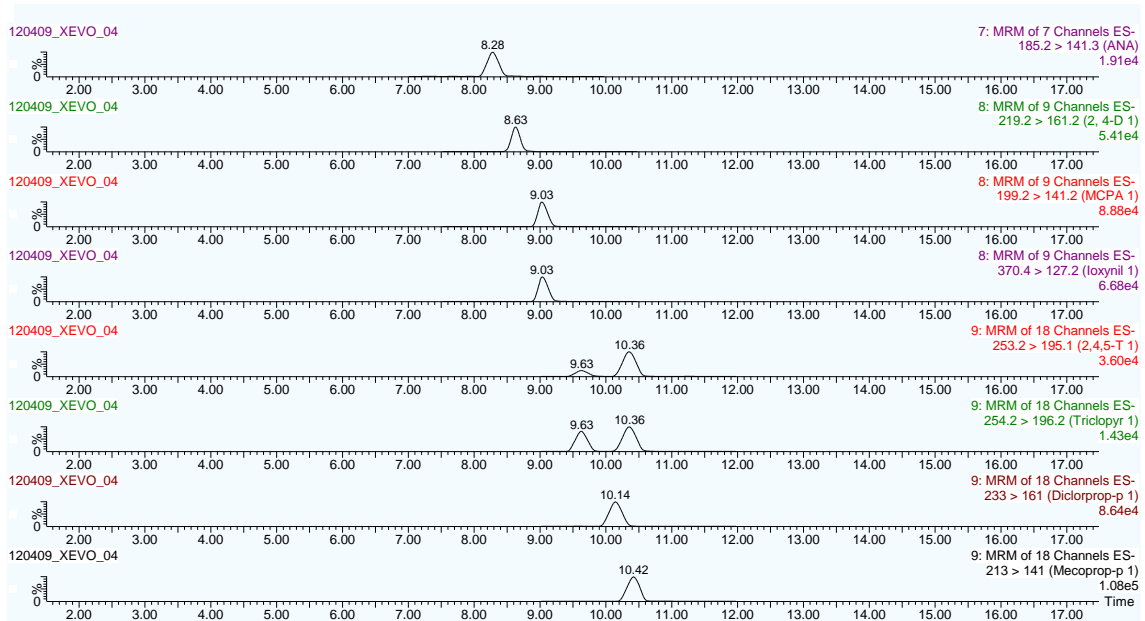
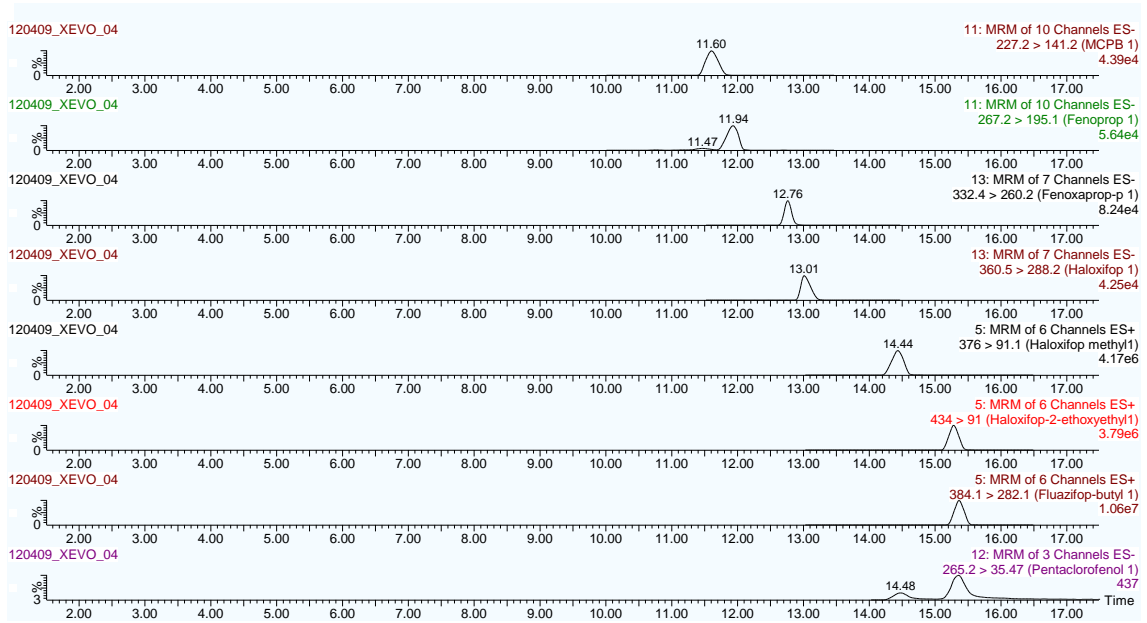


Figura 9: Cromatograma de analitos según tiempo de retención.



7 VALIDACIÓN

7.1 SELECCIÓN DE MATRICES REPRESENTATIVAS

Para la validación del método desarrollado en este trabajo se seleccionan diferentes matrices en función de las muestras reales que más frecuentemente se analizan en el laboratorio. Para la selección de las matrices representativas donde se va a llevar a cabo la validación del método nos basamos en las distintas propiedades que presentan las matrices a analizar y en la división de frutas, hortalizas y cereales que hace el Documento SANCO. Como el objeto del análisis de este estudio son frutas y hortalizas, elegimos dos matrices diferentes en primer lugar pepino como matriz representativa de muestras con alto contenido en agua y en segundo lugar naranja como matriz representativa de muestras con elevada naturaleza ácida.

7.2 EFECTO MATRIZ

A la hora de desarrollar un método analítico para la determinación de plaguicidas en muestras de alimentos es importante considerar y estudiar aquellos parámetros críticos que puedan ocasionar errores en la cuantificación de los analitos de interés.

Uno de los problemas más típicos que se debe evaluar cuando se desarrollan métodos cuantitativos con sistemas LC-MS es el denominado “efecto matriz” que se define como el aumento o disminución no esperada de la respuesta de los analitos de interés, que se produce por la coelución de otros componentes presentes en la matriz extraídos de la muestra.

Dependiendo de la interfase en la cual tiene lugar la ionización y el proceso de evaporación del ion, la competencia de la matriz puede disminuirla sustancialmente o aumentarla, fenómenos que se denominan supresión de la señal y exaltación de la señal, respectivamente. Este efecto no es universal ya que depende de la naturaleza del analito y de la matriz según estudios llevados a cabo por otros investigadores con objeto de evaluar dicho efecto. [29]

En este trabajo se ha estudiado el efecto matriz comparando rectas de calibrado preparadas tanto en disolvente como en extractos blancos de las dos matrices representativas. Las concentraciones de cada uno de los analitos en las disoluciones patrón de calibrado se han indicado previamente (ver tabla 6).

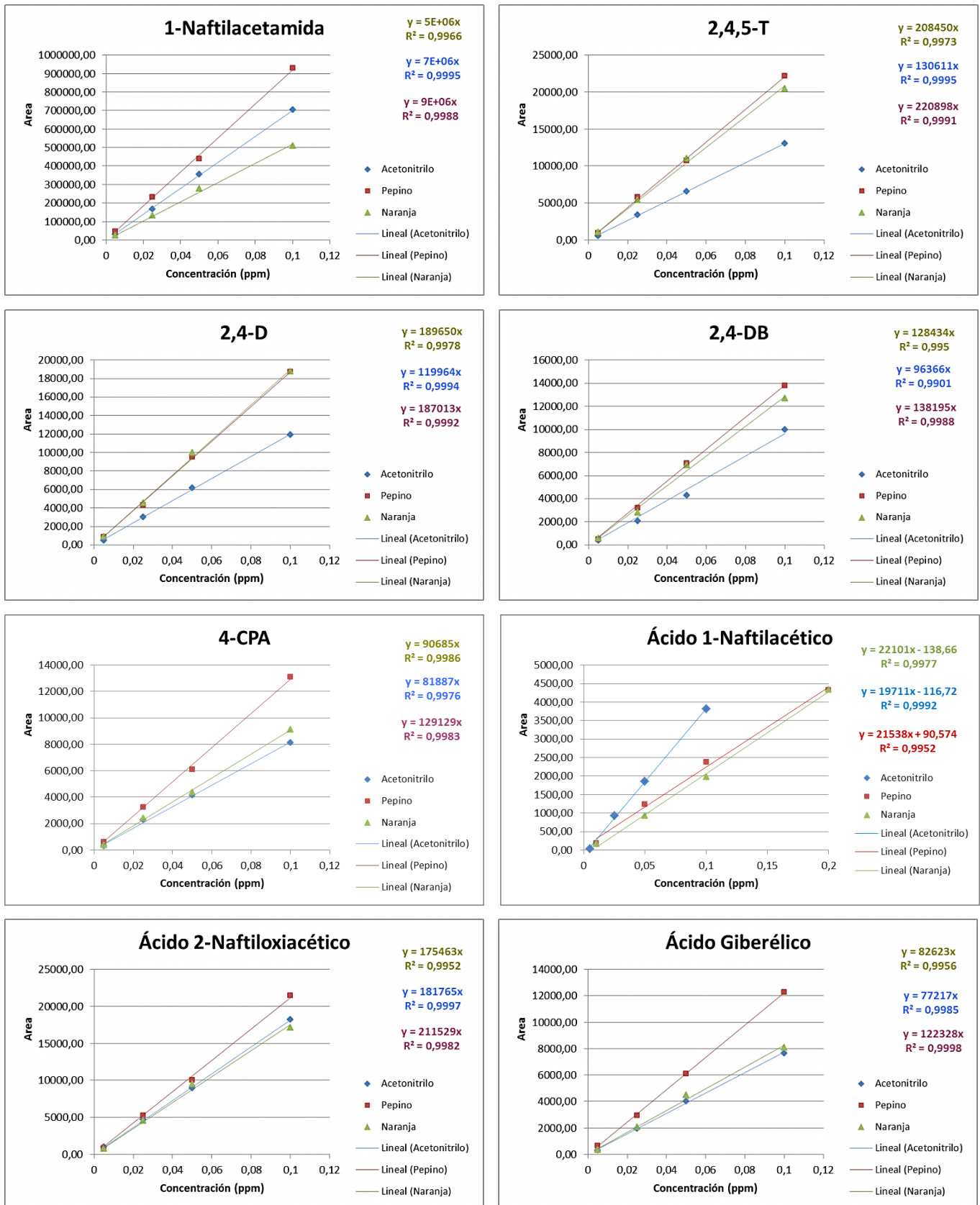
En la tabla 11 se muestran las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas a partir del ajuste por mínimos cuadrados parciales de las concentraciones de cada analito en las disoluciones patrón y las áreas de pico obtenidas en cada caso, excepto para bentazona para la que fue necesario hacer un ajuste cuadrático.

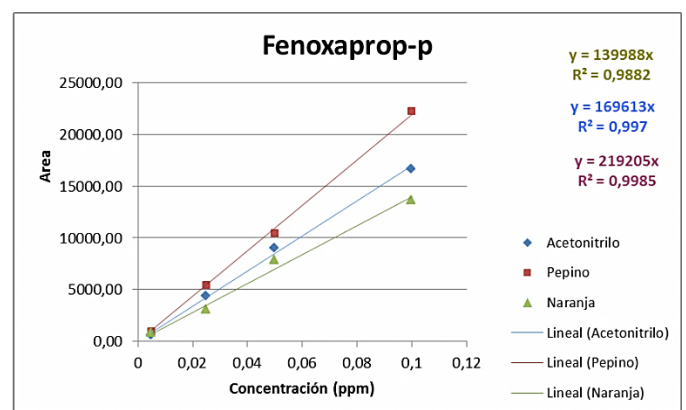
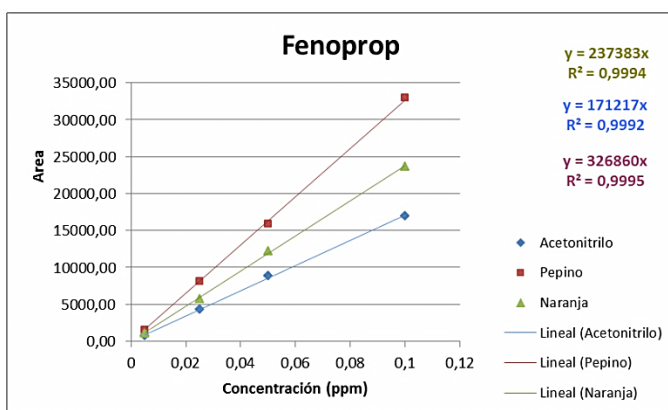
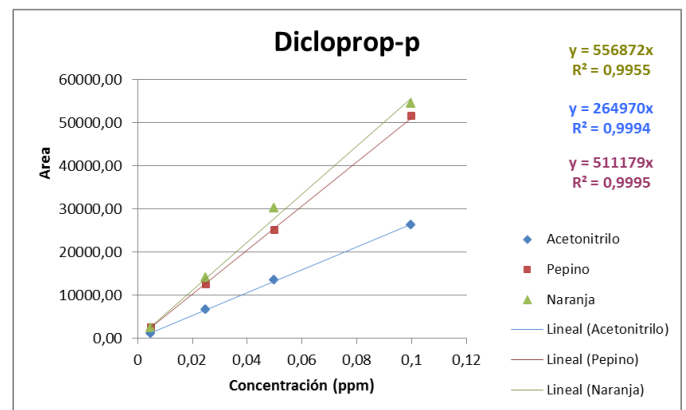
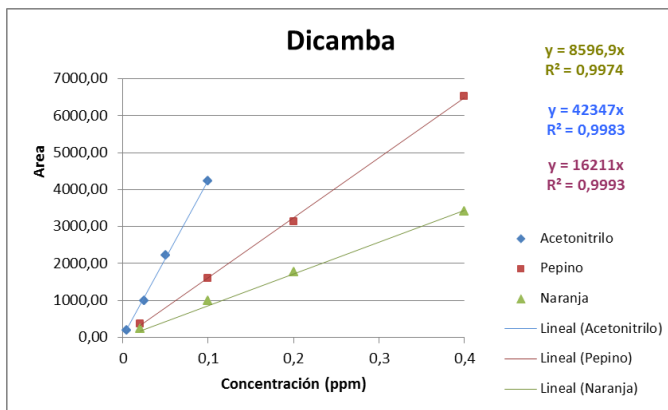
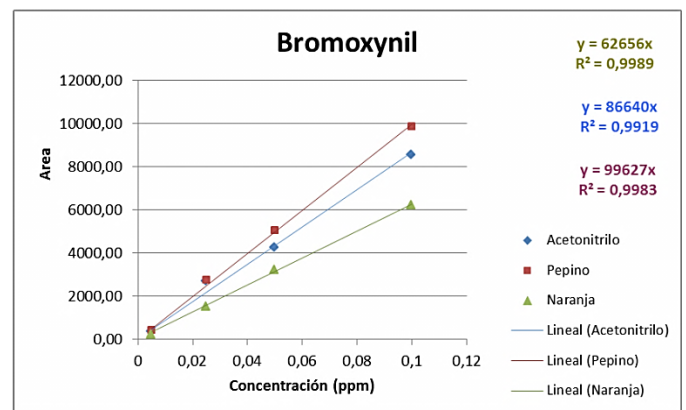
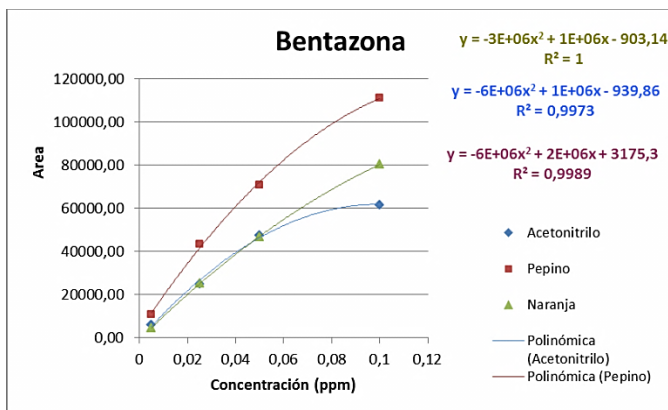
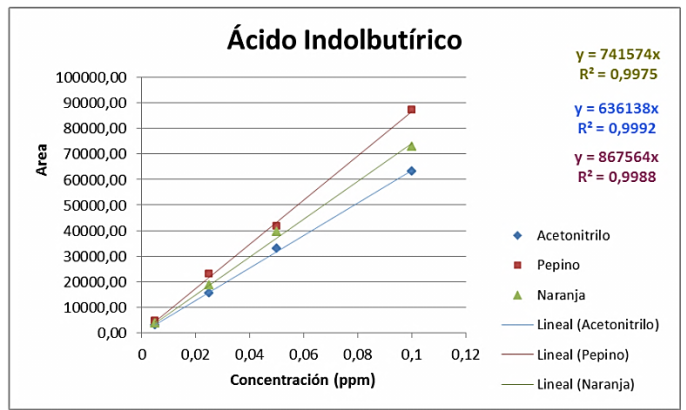
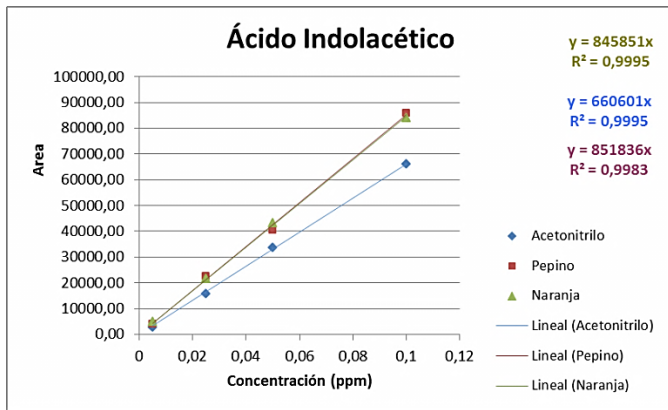
Tabla 11: Evaluación del efecto matriz utilizando pepino y naranja como matriz (los datos de la tabla corresponden a las pendientes de las gráficas obtenidas).

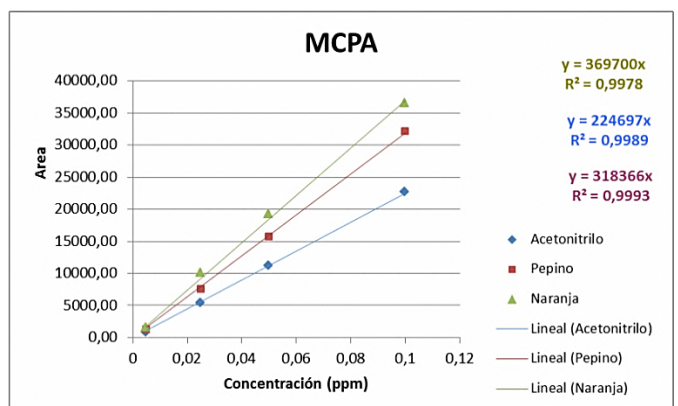
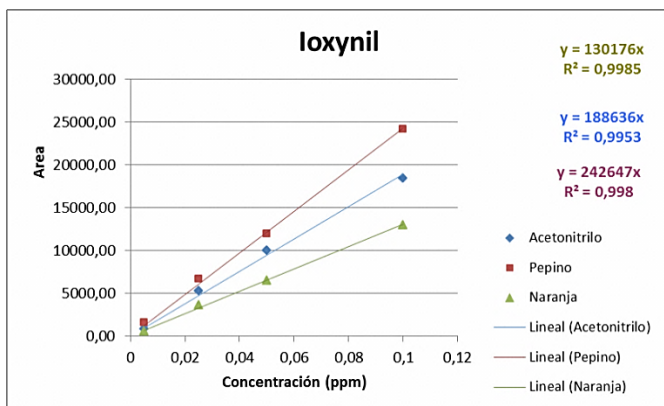
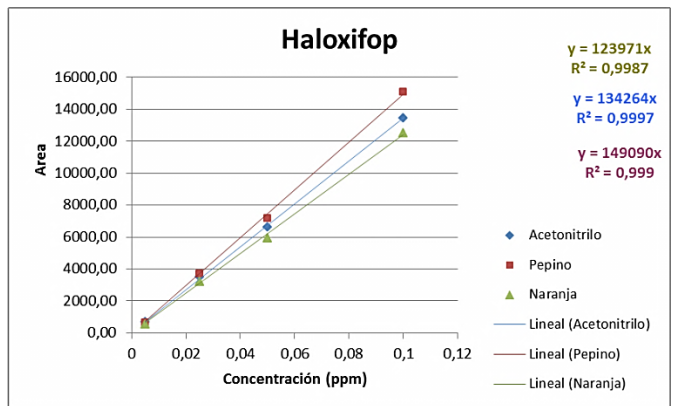
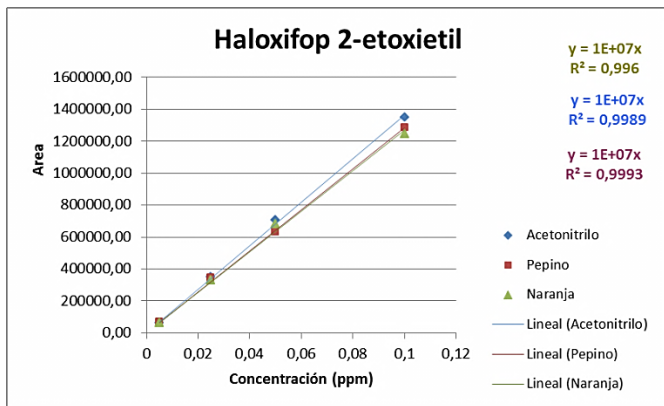
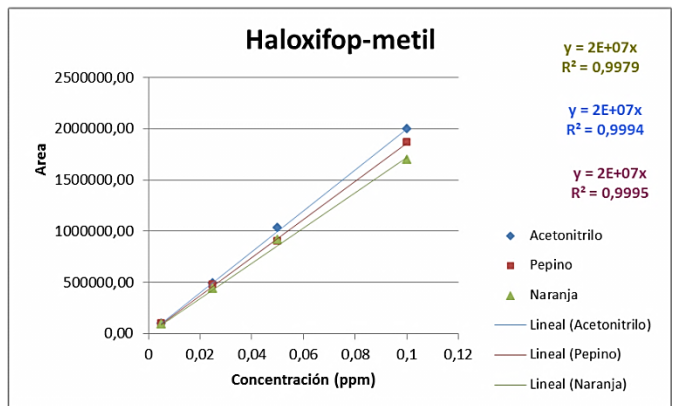
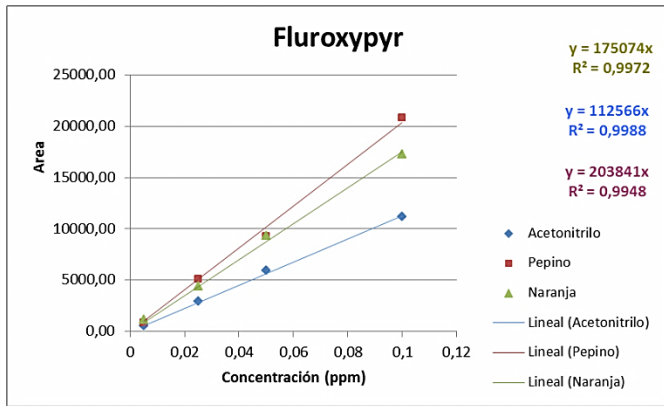
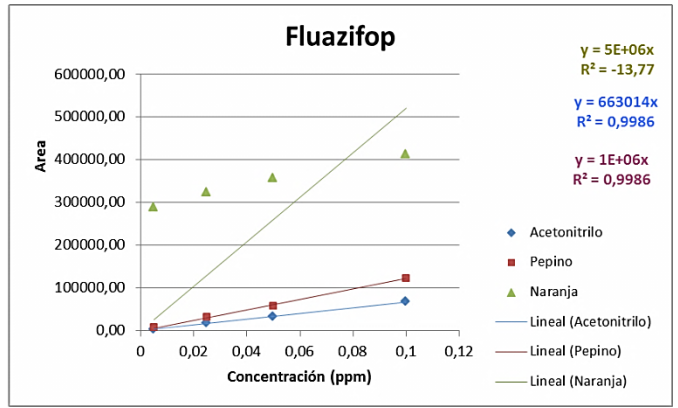
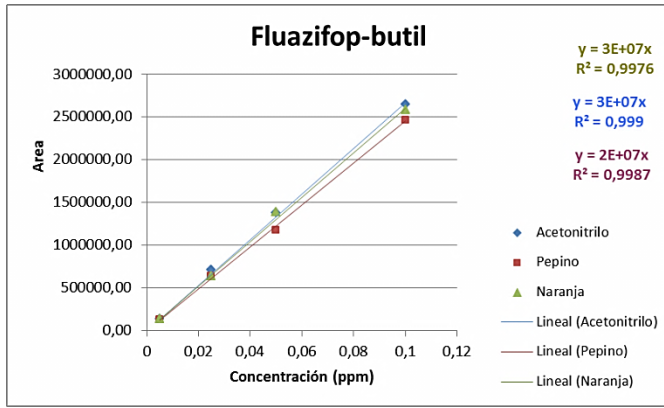
Analito	Disolvente	Pepino	Naranja
1-Naftilacetamida	$7 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
2,4,5-T	130611	220898	208450
4,4-D	119964	187013	189650
2,4-DB	96366	138195	128434
4-CPA	81887	129129	90685
Ác. 1-Naftilacético	37825	44316	42304
Ác. 2-Naftiloxiacético	181765	211529	175463
Ác. Giberélico	77217	122328	82623
Ác. Indolacético	660601	851836	845851
Ác. Indolbutírico	636138	867564	741574
Bromoxynil	86640	99627	62656
Dicamba	42347	64845	34388
Dicloprop-p	264970	511179	556872
Fenoprop	171217	326860	237383
Fenoxaprop-p	169613	219205	139988
Fluazifop-butil	$3 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$
Fluazifop	663014	$1 \cdot 10^6$	-
Fluroxypyr	112566	203841	175074
Haloxifop-metil	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$
Haloxifop-2-etoxietil	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
Haloxifop	134264	149090	123971
Ioxynil	188636	242647	130176
MCPA	224697	318366	369700
MCPB	100734	121284	128317
Mecoprop-p	376462	662772	660030
Pentaclorofenol	1753.1	1693.4	1791.4
Picloram	55252	72031	43477
Quinmerac	$4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
Triclopyr	32763	44855	38727

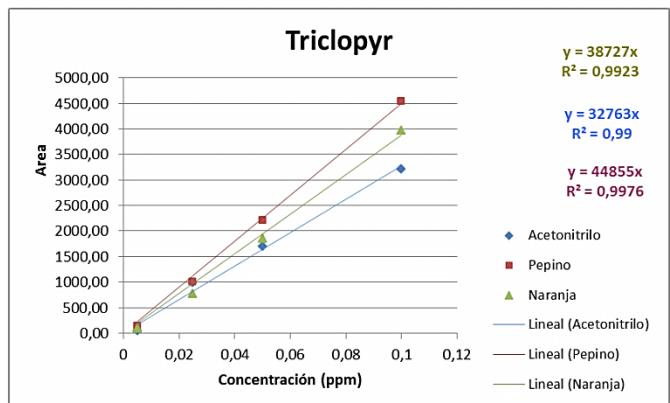
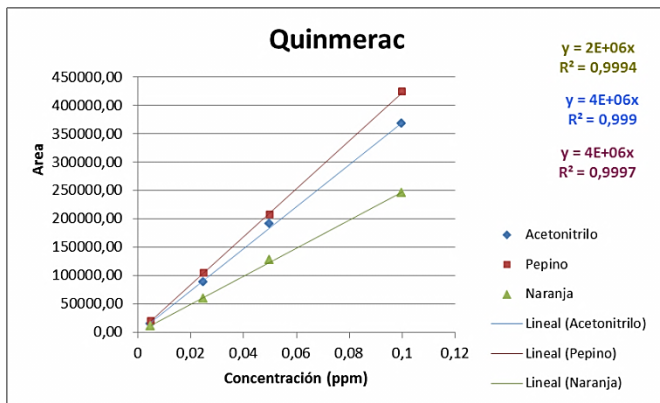
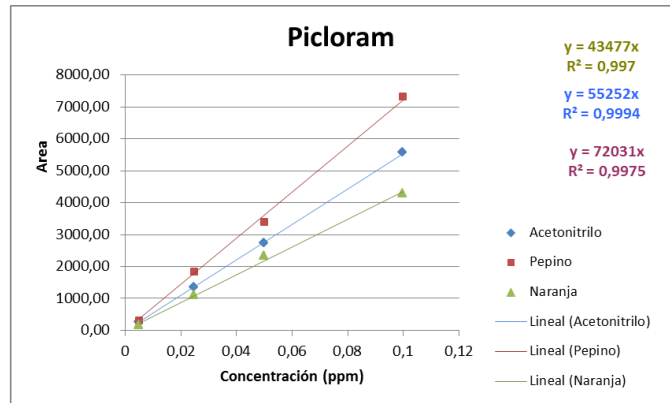
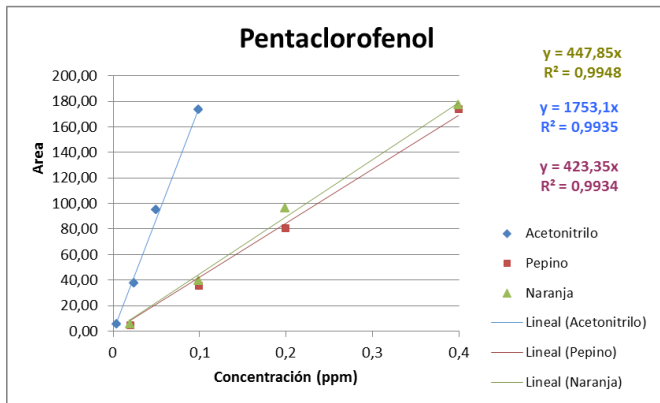
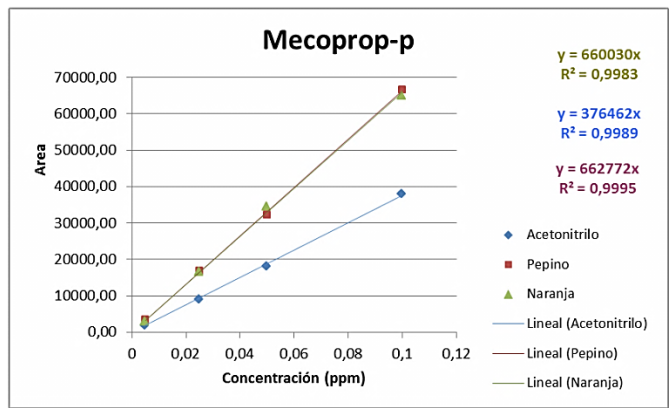
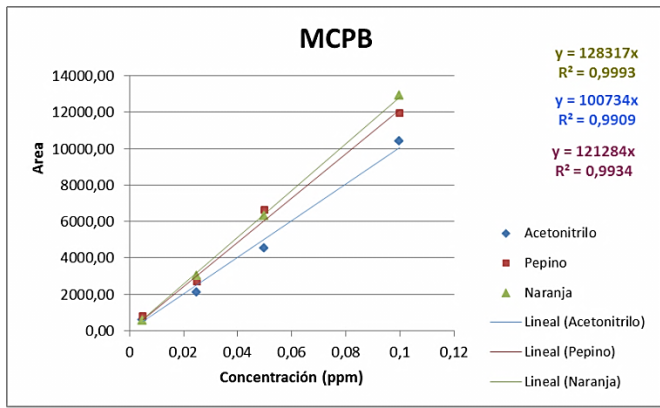
A continuación en la figura 10 se representan las curvas de calibrado obtenidas para cada uno de los analitos en disolvente y en las dos matrices seleccionadas (pepino y naranja).

Figura 10: Evaluación del efecto matriz utilizando pepino y naranja como matriz y acetónitrilo como disolvente (gráficas obtenidas representando la concentración frente al área de pico).









Los resultados obtenidos en este estudio muestran comportamientos muy distintos para los analitos y en las dos matrices seleccionadas, encontrando efecto matriz en la mayoría de los casos.

Además hay que destacar que en el caso de la naranja, para el fluzifop no se puede obtener una ecuación de la recta comparable con el pepino, debido a la presencia de interferencias en la matriz que originan una señal que solapa con la del analito.

7.3 LINEALIDAD

El intervalo de linealidad para cada uno de los analitos se estudió mediante la preparación de rectas de calibrado en las dos matrices objeto de estudio (pepino y naranja), en el rango de concentraciones de 0.005 mg/kg a 0.10 mg/kg (ver tabla 6) exceptuando los compuestos 1-naftilacético, dicamba, pentaclorofenol y daminozida cuyas concentraciones fueron superiores debido a su baja sensibilidad y cuyas concentraciones se han mostrado anteriormente en la tabla 7.

Las gráficas obtenidas para cada analito se muestran en la figura 10, obteniendo tras el ajuste por mínimos cuadrados parciales coeficientes de regresión mayores al 98% en el intervalo de concentraciones seleccionado.

Hay que destacar que para el caso de bentazona el ajuste es cuadrático, obteniéndose coeficientes de regresión del 99%. Además para el caso de fluazifop el coeficiente de regresión no se ajusta a los descritos anteriormente para el caso donde se usa naranja como matriz, ya que existe una interferencia con dicha matriz que hace que no se obtengan datos ajustables a una línea recta.

7.4 SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

Para calcular la sensibilidad del método, se analizan los cromatogramas obtenidos para cada analito en muestras reales de pepino y naranja fortificadas a niveles de concentración correspondientes al primer punto de la recta de calibrado (ver tabla 6 y 7). En los cromatogramas obtenidos puede observarse que los picos de los analitos se encuentran muy bien definidos a esas concentraciones. A modo de ejemplo en las figuras 11 y 12 se muestran los picos de las transiciones de cuantificación y confirmación para diferentes analitos.

En algunos casos puede haber más de dos transiciones características de cada analito. Dichas transiciones se pueden incorporar al método, esto es una evidencia más de que se trata del analito de interés. Un ejemplo de esto se puede observar en el ácido 2-naftiloxiacético que se muestra en la figura 12.

Figura 11: Cromatograma de la 1-Naftilacetamida en fortificado real de pepino a concentración de 0.005 mg/kg.

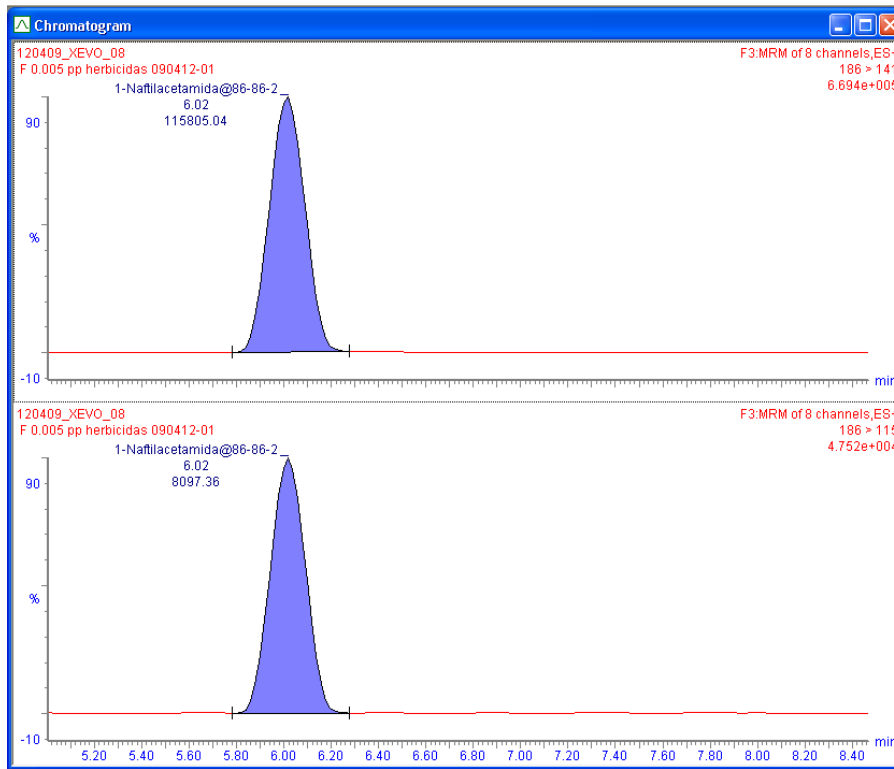
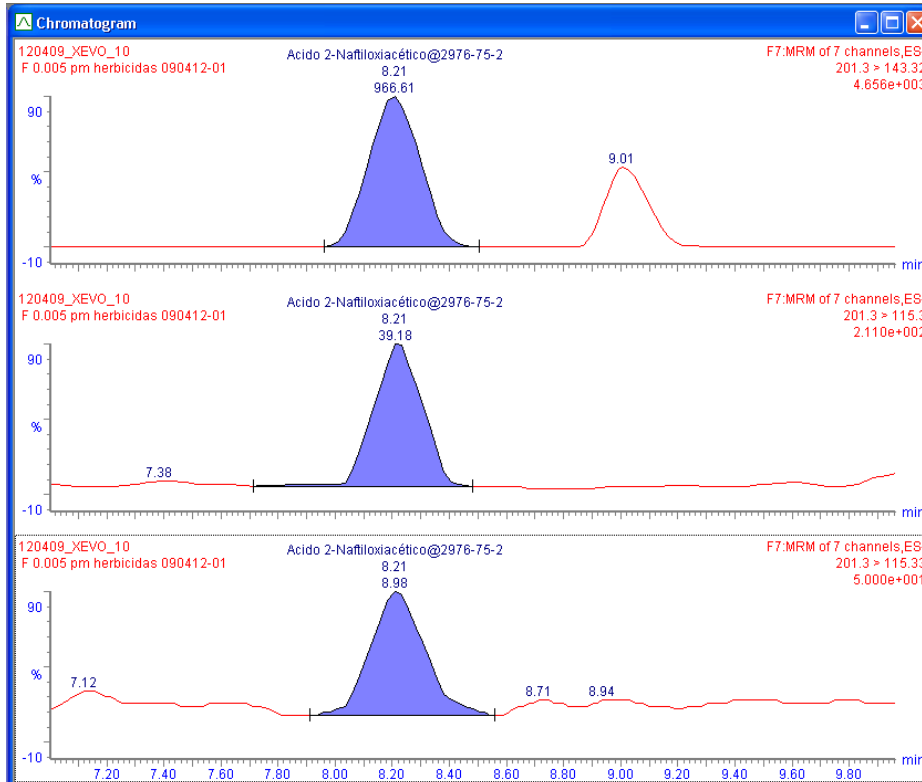


Figura 12: Cromatograma de la 1-Naftilacetamida en fortificado real de pepino a concentración de 0.005 mg/kg.



7.5 EXACTITUD

Para determinar la exactitud del método se hace un estudio de las recuperaciones de cada compuesto en cada una de las dos matrices estudiadas (pepino y naranja) y a dos niveles de fortificado (P1 y P2). P1 corresponde a una concentración de 0.005 mg/kg y P2 corresponde a una concentración de 0.1 mg/kg. Hay que considerar las siguientes excepciones: para el caso del ácido 1-naftilacético y dicamba el P1 y el P2 corresponden a unas concentraciones de 0.01 y 0.20 mg/kg y para los compuestos pentaclorofenol y daminozida las concentraciones para P1 y P2 son de 0.02 y 0.40 mg/kg.

Las recuperaciones se calculan a partir de 5 réplicas analizadas durante un mismo día para cada matriz y a los niveles de concentración descritos anteriormente. Además a partir de los datos obtenidos en este estudio se calcula repetibilidad del método para cada analito y en las dos matrices ensayadas.

Además, durante tres días más, se analiza una réplica diaria de cada uno de las dos matrices fortificada con los analitos de interés y a los dos niveles de concentración, para obtener al menos 4 réplicas y así calcular la reproducibilidad del método.

En la tabla 12 se muestran las recuperaciones medias obtenidas en cada uno de los experimentos realizados, estando comprendidas entre en todos los casos entre 70-120%, lo que está de acuerdo con las indicaciones que aparecen en el documento SANCO.

Tabla 12: Valores de recuperación (%) expresados en valores de exactitud y desviaciones estándar relativas (%) dados en valores de precisión (entre paréntesis).

ANALITO	PEPINO		NARANJA	
	P1	P4	P1	P4
1-Naftilacetamida	99 (10)	97 (10)	75 (5)	74 (2)
2,4,5-T	95 (20)	93 (13)	111 (7)	89 (5)
2,4-D suma	114 (7)	97 (7)	114 (10)	102 (11)
2,4-DB	106 (23)	110 (11)	119 (9)	99 (3)
4-CPA (ác. 4-clorofenoxiacético) suma	100 (20)	93 (8)	84 (12)	75 (3)
Acido 1-naftilacético (ANA)	100 (24)	103 (5)	76 (5)	76 (9)
Acido 2-Naftiloxiacético (BNOA)	100 (11)	95 (9)	84 (11)	80 (6)
Acido Giberélico	106 (22)	99 (5)	93 (3)	77 (8)
Acido indolacético	94 (24)	83 (15)	118 (6)	97 (7)
Acido indolbutírico	99 (7)	98 (4)	93 (21)	90 (12)
Bentazona	108 (4)	90 (15)	74 (2)	82 (8)
Bromoxynil (incl. Ésteres)	90 (13)	91 (10)	76 (8)	73 (1)
Daminocida	23 (25)	46 (104)	17 (27)	10 (8)
Dicamba	104 (9)	100 (7)	44 (27)	54 (44)
Diclorprop-p	101 (8)	97 (11)	118 (4)	107 (2)
Fenoprop (2,4,5-TP) suma	93 (10)	95 (12)	82 (8)	76 (2)
Fenoxaprop-p	92 (14)	90 (14)	83 (17)	75 (2)
Fluazifop butil	94 (9)	90 (11)	105 (18)	93 (10)
Fluazifop	104 (17)	99 (13)	4903 (9)	342 (5)
Fluroxypyr (incl. Ésteres)	108 (19)	97 (10)	88 (17)	83 (4)

Haloxifop metil	95 (10)	94 (9)	94 (15)	86 (6)
Haloxifop-2-etoxietil	93 (8)	92 (8)	96 (14)	90 (5)
Haloxifop	95 (18)	98 (10)	94 (16)	79 (5)
Ioxynil (incl. Ésteres)	90 (12)	90 (14)	75 (5)	72 (2)
MCPA	100 (5)	95 (8)	120 (16)	116 (11)
MCPB	87 (10)	89 (11)	95 (16)	85 (14)
Mecoprop-p	102 (10)	98 (12)	108 (7)	94 (5)
Nicarbazin	86 (7)	94 (10)	78 (2)	79 (3)
Pentaclorofenol	99 (18)	94 (5)	101 (20)	94 (10)
Picloram	75 (5)	91 (14)	73 (1)	72 (2)
Qinmerac	100 (4)	95 (9)	75 (5)	76 (3)
Triclopyr	81 (13)	95 (13)	92 (15)	97 (30)
Diclorprop suma	101 (8)	97 (11)	101 (4)	107 (2)
Fluazifop-P-butil	108 (7)	103 (11)	2921 (9)	247 (4)
Haloxifop suma	88 (11)	88 (8)	88 (13)	79 (4)
MCPA suma	88 (6)	87 (6)	101 (12)	95 (7)
Mecoprop (mcpp) suma	102 (10)	98 (12)	108 (7)	94 (5)

En los valores de recuperación obtenidos para los analitos no se observan diferencias significativas para pepino y naranja en las recuperaciones obtenidas para la mayoría de los compuestos estudiados, ya que en la mayoría de los casos las recuperaciones se encuentran entre el 70-120%.

Así, en las muestras de pepino se obtienen recuperaciones entre el 81% y 114%, excepto para daminozida cuyas recuperaciones son inferiores (23% y 46%), por lo que el método desarrollado no es adecuado para su cuantificación en dicha matriz.

Por otra parte, las recuperaciones obtenidas para los analitos en muestras de naranja son similares, estando comprendidas entre el 72% y 119%, excepto para daminozida, dicamba, fluazifop y fluazifop-butil cuyas recuperaciones se encuentran fuera del intervalo comprendido entre el 70 y 120%, por lo que tampoco el método desarrollado es válido para estos analitos en este tipo de matriz.

7.6 PRECISIÓN

La precisión es otro parámetro característico en la validación de un método analítico. Para ello, se calcula la media y la desviación estándar de las concentraciones obtenidas mediante el análisis 5 réplicas de cada matriz analizadas durante un mismo día (condiciones de repetibilidad) y 3 réplicas más analizadas durante distintos días (condiciones de reproducibilidad) de muestras fortificadas con las concentraciones de los puntos 1 y 4 que se muestran en la tabla 7.

Los valores de precisión se expresan como la desviación estándar relativa de todas las réplicas analizadas y se calculan a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Precisión \%} = \frac{SD}{\text{Media conc}} \times 100$$

Donde: SD es la desviación estándar de las concentraciones (mg/kg)

Media conc. es la concentración media (mg/kg)

Los valores que se obtienen tanto de las concentraciones medias como desviación estándar y valores de precisión se muestran en la tablas 13 y 14.

Tabla 13: Valores de concentración media, desviación estándar y precisión (en %) de fortificados a niveles 1 y 2 que corresponden al punto 1 y 4 (tabla 5) utilizando como matriz pepino

NOMBRE	PEPINO					
	NIVEL 1			NIVEL 2		
	SD	Media conc	PRECISION	SD	Media conc	PRECISION
1-Naftilacetamida	0,00051	0,0049	10	0,00929	0,0969	10
2,4,5-T	0,00094	0,0048	20	0,01251	0,0934	13
2,4-D suma	0,00042	0,0057	7	0,00716	0,0968	7
2,4-DB	0,00146	0,0053	23	0,01252	0,1097	11
4-CPA (ác. 4-clorofenoxiacético) suma	0,001	0,005	20	0,00721	0,0934	8
Acido 1-naftilacético (ANA)	0,00253	0,0101	24	0,00927	0,2055	5
Acido 2-Naftiloxiacético (BNOA)	0,00053	0,005	11	0,00846	0,0954	9
Acido Giberélico	0,00118	0,0053	22	0,00452	0,0991	5
Acido indolacético	0,00132	0,0047	24	0,01262	0,0827	15
Acido indolbutírico	0,00034	0,0049	7	0,00423	0,0975	4
Bentazona	0,00024	0,0054	4	0,01385	0,0896	15
Bromoxynil (incl. Ésteres)	0,0006	0,0045	13	0,00894	0,0911	10
Daminocida	0,00116	0,0046	25	0,19	0,1831	104
Dicamba	0,00095	0,0103	9	0,00729	0,1006	7
Diclorprop-p	0,00038	0,005	8	0,01098	0,097	11
Fenoprop (2,4,5-TP) suma	0,00045	0,0047	10	0,01168	0,0946	12
Fenoxaprop-p	0,00065	0,0046	14	0,01219	0,0902	14
Fluazifop butil	0,00041	0,0047	9	0,00998	0,0897	11
Fluazifop	0,00088	0,0052	17	0,01333	0,0988	13
Fluroxypyr (incl. Ésteres)	0,00103	0,0054	19	0,01002	0,0966	10
Haloxifop metil	0,00046	0,0048	10	0,00864	0,0942	9
Haloxifop-2-etoxietil	0,00038	0,0047	8	0,00772	0,0925	8
Haloxifop	0,00085	0,0048	18	0,00979	0,0976	10
Ioxynil (incl. Ésteres)	0,00052	0,0045	12	0,0121	0,0896	14
MCPA	0,00023	0,005	5	0,00727	0,0952	8
MCPB	0,00044	0,0044	10	0,01012	0,0885	11
Mecoprop-p	0,0005	0,0051	10	0,01203	0,098	12
Nicarbazin	0,00642	0,0858	7	0,00932	0,0942	10
Pentaclorofenol	0,00364	0,0198	18	0,02004	0,3777	5
Picloram	0,00019	0,0037	5	0,01312	0,0911	14
Qinmerac	0,00022	0,005	4	0,00826	0,0951	9
Triclopyr	0,00051	0,004	13	0,01217	0,0947	13
Diclorprop suma	0,00038	0,005	8	0,01098	0,097	11
Fluazifop-P-butil	0,0004	0,0054	7	0,01155	0,1026	11
Haloxifop suma	0,00049	0,0044	11	0,00708	0,0885	8
MCPA suma	0,00025	0,0044	6	0,00561	0,0864	6
Mecoprop (mcpp) suma	0,0005	0,0051	10	0,01203	0,098	12

Tabla 14: Valores de concentración media, desviación estándar y precisión (en %) de fortificados a niveles 1 y 2 que corresponden al punto 1 y 4 (tabla 7) utilizando como matriz naranja

NOMBRE	NARANJA					
	NIVEL 1			NIVEL 2		
	SD	Media conc	PRECISION	SD	Media conc	PRECISION
1-Naftilacetamida	0,00017	0,0038	5	0,00128	0,0737	2
2,4,5-T	0,00042	0,0056	7	0,00441	0,0891	5
2,4-D suma	0,00059	0,0057	10	0,01105	0,1016	11
2,4-DB	0,00051	0,006	9	0,00315	0,0985	3
4-CPA (ác. 4-clorofenoxiacético) suma	0,00048	0,0042	12	0,00224	0,0755	3
Acido 1-naftilacético (ANA)	0,00039	0,0076	5	0,01361	0,1529	9
Acido 2-Naftiloxiacético (BNOA)	0,00046	0,0042	11	0,00512	0,0798	6
Acido Giberélico	0,00013	0,0046	3	0,00606	0,0771	8
Acido indolacético	0,00037	0,0065	6	0,00643	0,0971	7
Acido indolbutírico	0,00095	0,0046	21	0,01107	0,0901	12
Bentazona	0,00009	0,0037	2	0,00671	0,0823	8
Bromoxynil (incl. Ésteres)	0,00032	0,0038	8	0,0009	0,0727	1
Daminocida	0,00089	0,0033	27	0,0032	0,0397	8
Dicamba	0,00059	0,0022	27	0,02353	0,0536	44
Diclorprop-p	0,00028	0,0064	4	0,00213	0,1066	2
Fenoprop (2,4,5-TP) suma	0,00033	0,0041	8	0,00186	0,0757	2
Fenoxaprop-p	0,00069	0,0041	17	0,00184	0,0746	2
Fluazifop butil	0,00092	0,0053	18	0,00911	0,0928	10
Fluazifop	0,02164	0,2452	9	0,0182	0,3424	5
Fluroxypyr (incl. Ésteres)	0,00076	0,0044	17	0,00312	0,0825	4
Haloxifop metil	0,0007	0,0047	15	0,00488	0,0861	6
Haloxifop-2-etoxietil	0,00066	0,0048	14	0,00429	0,0899	5
Haloxifop	0,00076	0,0047	16	0,00409	0,0787	5
Ioxynil (incl. Ésteres)	0,00018	0,0038	5	0,00152	0,0716	2
MCPA	0,00095	0,006	16	0,01303	0,1161	11
MCPB	0,00075	0,0047	16	0,01168	0,0846	14
Mecoprop-p	0,00036	0,0054	7	0,0045	0,0938	5
Nicarbazin	0,00179	0,0784	2	0,00238	0,0793	3
Pentaclorofenol	0,00523	0,0202	20	0,03912	0,3755	10
Picloram	0,00005	0,0037	1	0,00141	0,0721	2
Qinmerac	0,0002	0,0038	5	0,00222	0,0756	3
Triclopyr	0,00068	0,0046	15	0,029	0,0973	30
Diclorprop suma	0,00028	0,0064	4	0,00213	0,1066	2
Fluazifop-P-butil	0,01288	0,1461	9	0,0102	0,2467	4
Haloxifop suma	0,00057	0,0044	13	0,00307	0,0789	4
MCPA suma	0,00059	0,0051	12	0,00686	0,0952	7
Mecoprop (mcpp) suma	0,00036	0,0054	7	0,0045	0,0938	5

Para la validación del método, hay que seguir un criterio de aceptación en cuanto a la selectividad. Este criterio vendrá dado por los siguientes requisitos:

-La precisión debe ser igual o menor al 25% para rangos de concentración de las muestras de referencia $\geq 0.003 < 0.01$ mg/kg

-La precisión debe ser igual o menor al 20% para rangos de concentración de las muestras de referencia ≥ 0.01 mg/kg

En la tabla 13 se observa que la daminocida no cumple estos criterios, por tanto, no se podrá proceder a la validación de este compuesto en matriz de pepino.

En la tabla 14 se observa que los compuestos daminocida y dicamba no cumplen estos criterios, por tanto no se podrá proceder a la validación de dichos analitos utilizando como matriz la naranja.

7.7 LODs Y LOQs

El LOD o límite de detección se define como la concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico. En este trabajo no se han hecho pruebas para obtener los valores de LODs. Esto se debe a que con este método obtenemos picos bien definidos a concentraciones lo suficientemente bajas para que se encuentren muy por debajo del límite máximo de residuos de cada analito.

El límite de cuantificación o LOQ se define como el límite de concentración más bajo para mediciones cuantitativamente precisas. El criterio para la elección del LOQ se basa en los LMR. Teniendo en cuenta que el valor más restrictivo de los LMR es de 0.01, elegimos como concentración la mitad de dicho valor. Hay que exceptuar el caso del ácido 1-naftilacético, el dicamba, el pentaclorofenol y la daminozida, para los cuales las concentraciones serán mayores, ya que estos compuestos tienen menor sensibilidad.

Por tanto, en este trabajo, el LOQ corresponde a concentraciones de 0.005 mg/kg, a excepción del ácido 1-naftilacético y el dicamba que será de 0.01 mg/kg y el pentaclorofenol y la daminozida que será de 0.02 mg/kg. Estas concentraciones son las mismas que las del punto 1 de la recta de calibrado.

8 CONCLUSIONES

A continuación se destacan las principales conclusiones derivadas del presente Trabajo Fin de Máster:

-Se ha desarrollado un método rápido y de bajo coste para el análisis de 7 fitorreguladores y 22 herbicidas con carácter ácido en matrices vegetales y frutas pertenecientes al grupo 1 y 2, según el Reglamento (CE) nº 600/2010 de 8 de Julio de 2010 de La Comisión Europea de Seguridad Alimentaria.

-Para la puesta a punto y validación del método en muestras reales se han seleccionado dos matrices: pepino y naranja como matrices representativas de frutas y hortalizas con alto contenido en agua y naturaleza ácida, respectivamente.

-La extracción de los analitos de las matrices se ha realizado utilizando dos métodos basados en la extracción QuEChERS. En el primero de ellos se añade una disolución tampón a la muestra y los analitos se extraen en un polytron y en el segundo la extracción se realiza añadiendo citratos y utilizando el sistema agitax. En ninguno de los dos métodos se aplicó una etapa adicional de limpieza de los extractos, obteniendo las mejores recuperaciones con el segundo de los métodos (entre el 70 y 120% para la mayoría de los analitos), estando dentro de los valores indicados por el documento SANCO. [15]

- Para el análisis de los plaguicidas en los extractos se ha optimizado un método mediante la técnica de LC acoplada a detector MS de triple cuadrupolo y utilizando como interfase electrospray, siendo el tiempo total de análisis para cada muestra de 20 minutos. En dichos 20 minutos se incluye la etapa de vuelta a las condiciones iniciales. Para la identificación y confirmación de los analitos se han usado dos transiciones una de cuantificación y otra de confirmación.

- Se ha llevado a cabo un estudio del efecto de la matriz sobre la señal de los analitos mediante la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado preparadas en disolventes y preparadas en extracto blanco de matriz de pepino y de naranja, encontrando para la mayoría de los analitos que la matriz afecta a la su señal y que este efecto depende de la naturaleza de la matriz. Por este motivo, la cuantificación de los analitos en las muestras reales se lleva a cabo utilizando patrones preparados en extracto blanco de matriz (pepino y naranja).

- El método puesto a punto se ha validado en términos de linealidad, sensibilidad, exactitud, precisión y límites de cuantificación, siguiendo los criterios del documento SANCO. Los resultados obtenidos en la validación del método son adecuados para su aplicación al análisis de residuos de ambas familias de plaguicidas, excepto para daminozina en pepino y

naranja y para dicamba, fluazifop y fluazifop-P-butil en naranja debido principalmente a las malas recuperaciones que se obtienen y a la presencia de interferencias de la matriz.

9 COMPETENCIAS ADQUIRIDAS

A través del desarrollo del trabajo experimental anteriormente expuesto y dándoles las gracias a D. Antonio Belmonte (director de Sica AgriQ), D. Francisco Garrido (departamento de I+D de Sica AgriQ), Amadeo Rodríguez y María Dolores Gil García del departamento de hidrogeología y química analítica de la Universidad de Almería he adquirido las siguientes competencias:

- El manejo de bibliografía y el análisis de los resultados encontrados ha permitido incrementar mi **capacidad de análisis y síntesis**.

- La lectura de artículos de difusión internacional, ha repercutido en una mejora del **conocimiento de una lengua extranjera** así como en el aprovechamiento dicha información para la resolución de problemas y el avance en el trabajo experimental, - El desarrollo del trabajo experimental me ha exigido un considerable esfuerzo en cuanto a **organización y planificación**.

- Durante la optimización de los métodos analíticos seleccionados para el desarrollado del trabajo experimental he conseguido competencias relativas a la **resolución de problemas y toma de decisiones**.

- La elaboración de esta memoria y la preparación de su defensa oral me ha permitido trabajar la **comunicación y escritura**.

- En definitiva todas las actividades realizadas durante el desarrollo de este Trabajo Fin de Máster han propiciado mi capacidad **aprendizaje de forma más autónoma**.

10 BIBIOGRAFÍA CONSULTADA

- [1] **“Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives.”** Costa, L.G., Galli, C.L., Murphy, S.D., (1987). Springer-Verlag, Berlín.
- [2] <http://www.fao.org/docrep/w5975s/w5975s08.htm>
- [3] **“Organochlorine pesticides in water, sediment, crops, and human fluids in a farming community in Ghana”** Ntow, W.J. 2001 Archives of Environmental Contamination and Toxicology 40 (4) , pp. 557-563
- [4] www.wikipedia.com
- [5] The e-Pesticide Manual (13 edn)
- [6] **“Química Ambiental”** X. Domenech,. Miraguano Ediciones (2ª Ed), Madrid (1997) 48.
- [7] <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm>
- [8] <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/reference/glossary.html?lang=es>
- [9] http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm
- [10] <http://quechers.cvua-stuttgart.de/>
- [11] **“Mass Spectrometry: Principles and Applications”** Hoffmann et al. 2002
- [12] **“Liquid Chromatography-Mass Spectrometry”** Niessen, 2006. Tercera edición.
- [13] **“Fundamentals of contemporary Mass Spectrometry”** Dass, 2007
- [14] **“Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry”** Blakey, C.R.; Vestal, M.L . (1983), Anal. Chem. 55, 750-754
- [15] **“Method Validation and Quality Control procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed”** Document N° SANCO/10684/2009
- [16] **“Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry”**, Antonia Garrido Frenich, José Luis Martínez Vidal, Roberto Romero-González, María del Mar Aguilera-Luiz; Food Chemistry 117 (2009); Department of Analytical Chemistry, Almeria University.
- [17] **“Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (Cocos nucifera L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction”**, Zhen Maa, Liya Gea, Anna S.Y. Leea, Jean Wan Hong Yonga, Swee Ngin Tana, Eng Shi Ong; Analytica Chimica acta (2 0 0 8)

- [18] **“Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water”** G. Gervais a,b, S. Brosillon, A. Laplanchea, C. Helenb; *Journal of Chromatography A*, (2008)
- [19] **“Determination of the Phenoxyacid Herbicides MCPA, Mecoprop and 2,4-D in Kidney Tissue Using Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry”** Andrew J. A. Charlton, Vicki Stuckey, Mark D. Sykes; *Bull Environ Contam Toxicol* (2009)
- [20] **“Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry”** Shengjie Houa,b, Jiang Zhuh, Mingyu Dinga, Guohua Lv; *Talanta* (2008)
- [21] **“Determination of Acidic Herbicides using an Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS Equipped with Agilent Jet Stream Technology and Direct Aqueous Injection, for Potable and Environmental Samples”** Neil Cullum et al., Agilent Technologies, 2009
- [22] **“Determination of Chlorinated Acid Herbicides in Soil by LC/MS/MS”** Chin-Kai Meng, Agilent Technologies, 2006
- [23] **“Trace Analysis of Chlorinated Herbicides in Water with Online Enrichment”**, Srividya Kailasam, Agilent Technologies, 2010
- [24] **“Determination of Acidic Herbicides in Groundwater and Potable Water by LC/MSD Using Selective Ion Monitoring”**, Neil Cullum et al. Agilent Technologies, 2010
- [25] **“Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry”**, E. Michael Thurman and Imma Ferrer, Agilent Technologies, 2008
- [26] **“Determination of 1-Naphtylacetic Acid in Commercial Formulations and Natural Waters by Solid-Phase Spectrofluorimetry”** Alberto Navalón, Rosario Blanc and José Luiz Vilchez, *Mikrochimica Acta*, 1997
- [27] **“Determination strategies of phytohormones: recent advances”**, Yu Bai, Fuyou Du, Yu Bai and Huwei Liu, *Analytical Methods*, 2010
- [28] **“Analysis of Acidic Pesticides in Wheat Flour Samples by LC-MS(/MS) using the QuEChERS Method”**, Michelangelo Anastassiades, CRL for Single Residue Methods, 2007.
- [29] **“Method development and validation for determination of thiosultap sodium, thiocyclam, and nereistoxin in pepper matrix”**, Ferrer, C. Mezcuca, M. Martínez-Uroz, M.A., Pareja, L., Lozano, A., Fernández-Alba, A.R., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010