

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales



Grado en Química

**Validación del método de extracción QuEChERS
modificado para la determinación de plaguicidas en suelo**

**Validation of the modified QuEChERS extraction method
for pesticides determination in soil**

Antonio David López Sánchez
Curso académico 2018-2019
15 de septiembre de 2019

Tutor/es
Dra. María Martínez Galera
Departamento de Química y Física
Dra. María Jesús Martínez Bueno
Departamento de Química y Física

Validación del método de extracción QuEChERS modificado para la determinación de plaguicidas en suelo

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
Antonio David López Sánchez

Almería, a 15 de septiembre de 2019

Fdo: Antonio David López Sánchez

Life is a relationship between molecules

Linus Pauling

*Asegurémonos, pues, merced a una investigación bibliográfica cuidadosa,
de la originalidad del hecho o idea que deseamos exponer,
y guardémonos además de dar a luz prematuramente el fruto de la observación
Cuando nuestro pensamiento fluctúa todavía entre conclusiones diversas
y no tenemos plena conciencia de haber dado en el blanco,
ello es señal de haber abandonado harto temprano el laboratorio.
Conducta prudente será volver a él y esperar a que,
bajo el influjo de nuevas observaciones, acaben de cristalizar nuestras ideas.*

Santiago Ramón y Cajal “Reglas y consejos”

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis tutoras Dña. María Martínez Galera y Dña. María Jesús Martínez Bueno por su conocimiento y ayuda.

También agradecer a D. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba por permitirme realizar este Trabajo Fin de Grado en su laboratorio. Quiero hacer una mención especial al equipo de investigación, en especial a Dña. María del Mar Gómez Ramos, por su paciencia y ayuda durante el desarrollo del trabajo.

Por último, agradecer a mi familia por apoyarme en los momentos difíciles y por la educación que me han inculcado.

Sin todos ellos, esto no sería posible. Muchas gracias.

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. PRESENCIA DE PLAGUICIDAS EN AGUAS REGENERADAS	6
3.2. IMPACTO DE USO DE AGUAS REGENERADAS EN SUELO	9
3.2.1. Adsorción de plaguicidas al suelo	9
3.2.2. Factores que afectan a la adsorción, desorción y movimiento de plaguicidas en suelo	10
3.2.3. Evolución de plaguicidas en suelo	11
3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA EVALUACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS AMBIENTALES	12
3.3.1. Tratamiento de muestras ambientales	13
3.3.2. Técnicas de análisis	14
3.3.3. Espectrometría de masas	18
4. OBJETIVOS	23
5. EXPERIMENTAL	23
5.1. REACTIVOS Y MATERIALES	23
5.1.1. Reactivos químicos	23
5.1.2. Materiales y equipos	24
5.2. TOMA DE MUESTRA	25
5.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	26
5.3.1. Extracción de suelos fortificados	26
5.3.2. Extracción de muestras reales	26
5.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE MUESTRA	27
5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	29
6.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	32
7. CONCLUSIONES	34
8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	35
ANEXOS	37
ANEXO 1: Parámetros optimizados del método de análisis	39

1. RESUMEN

Los plaguicidas, también denominados pesticidas, son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos (de origen animal o vegetal) considerados plagas. Su uso evita que la producción de frutas y vegetales a nivel mundial, se reduzca entre un 30 y 40%. Sin embargo, un uso descontrolado de plaguicidas puede ser peligroso no solo para el hombre, sino también perjudicial para el medio ambiente, ya que muchos de ellos son persistentes y/o bioacumulativos. Por ello, numerosos métodos de análisis están constantemente en evolución para el correcto control de estos productos fitosanitarios no solo en alimentos sino también en el medio ambiente.

En este trabajo se ha desarrollado y validado un método d-SPE QuEChERS para el análisis de algunos de los plaguicidas frecuentemente utilizados en prácticas agrícolas en muestras de suelo, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS/MS), con el objetivo de estudiar la propagación y acumulación de dichos compuestos en el suelo tras utilizar en un cultivo agua de riego regenerada y fortificada con los plaguicidas objeto de estudio. El método fue validado teniendo en cuenta los parámetros establecidos en la GUÍA SANTE/11813/2017 (linealidad, veracidad, precisión y límites de cuantificación).

Palabras clave: *Plaguicidas, métodos de extracción, QuEChERS, muestras de suelo, LC-MS/MS*

2. ABSTRACT

Pesticides are chemical substances intended to kill, repel, attract, regulate or interrupt the growth of living organisms (of animal or plant origin) considered pests. Its use prevents a decrease in the production of fruits and vegetables between 30 and 40%. Although, an uncontrolled use of pesticides can be hazardous not only for humans, but also harmful for the environment, since many of them are persistent and/or bioaccumulative. Because of that, numerous methods of analysis are constantly evolving for the correct control of these phytosanitary products not only in food but also in the environment.

In this work, a d-SPE QuEChERS method has been developed and validated for the analysis of some pesticides frequently used in agricultural practices in soil samples, by liquid chromatography coupled to mass spectrometry with triple quadrupole analyzer (LC-QQQ-MS/MS), with the purpose of study the propagation and accumulation of these compounds in the soil samples. To carry out the study, regenerated water obtained from a desalination plant was spiked and used to irrigate a crop under controlled experimental conditions. The method was validated taking into account the established parameters in the GUIDE SANTE/11813/2017 (linearity, trueness, precision and limits of quantification).

Keywords: *Pesticides, extraction methods, QuEChERS, soil samples, LC-MS/MS*

3. INTRODUCCIÓN

Un plaguicida es el resultado de la combinación de una o varias sustancias activas, y se utiliza para eliminar o ahuyentar plagas. El concepto de plaga se refiere a aquellos organismos que aparecen de forma súbita y en gran cantidad, provocando diferentes daños a los cultivos, las personas, etc. El objetivo de usar plaguicidas no es sólo para combatir insectos u hongos, sino también para la eliminación de otras plantas u organismos de interés¹. Por ello, los plaguicidas son una herramienta importante en el desarrollo de la agricultura y su uso ha contribuido a la producción de alimentos y materias primas, debido a las exigencias de los estándares internacionales, a pesar de los esfuerzos realizados para encontrar métodos no químicos que sirvan al objetivo del control de las plagas².

El uso de los plaguicidas data de hace más de 200 años, cuando se usaban aceites y cenizas para la protección de los cultivos. Los plaguicidas, tal y como los conocemos, se masificaron por el descubrimiento del DDT en los años 40, abriendo la puerta a muchos tipos de plaguicidas como los carbamatos, organoclorados y organofosforados³. Gracias al desarrollo de los plaguicidas, el campo de la agricultura obtuvo un gran crecimiento. Durante los años 80, se utilizaron para proteger los cultivos de casi cualquier amenaza biótica, gracias a su bajo coste y gran efectividad. Sin embargo, se demostró que, a largo plazo, un uso descontrolado de plaguicidas perjudica el medio ambiente y es capaz de modificar las plagas, haciéndolas resistentes a los ellos¹.

Los insecticidas, herbicidas y fungicidas se aplican intensamente en muchos países, tanto desarrollados como del tercer mundo, pudiendo provocar la contaminación del agua dulce y suelo, afectando también al resto de fauna y flora. Los plaguicidas, destinados al control de plagas, también reducen la biodiversidad, interrumpiendo la cadena alimenticia mediante la destrucción de hierbas e insectos y, con ellos, las especies que sirven de alimento a pájaros y otros animales⁴.

El uso de plaguicidas se ha incrementado considerablemente a lo largo de los últimos 35 años, alcanzando tasas de crecimiento del 4 al 5,4 % en algunas regiones². En general, las ventas de plaguicidas están influenciadas por múltiples factores, incluidas las condiciones climáticas, los tipos de cultivos, la rentabilidad de la granja, los inventarios de distribuidores y las políticas agrícolas (Eurofins Agrosience Services Group, 2017)⁵, siendo España el país líder en ventas de los mismos⁶.

¹ Gardei, Ana; Pérez Porto, Julian; *Definición de plaguicida* [Online] <https://definicion.de/plaguicida/> (acceso 10 de julio de 2019).

² Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales; *Los plaguicidas y sus efectos en el Medio Ambiente marino: Capítulo 1* [Online] http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/002877/HTM/CAPITULO_1.HTM

³ Köck Schulmeyer, M.A.; *Plaguicidas polares en el medio ambiente*, Universidad de Barcelona, Barcelona, **2014**, 23-26.

⁴ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura; *Perspectivas para el medio ambiente: Agricultura y Medio Ambiente* [Online] <http://www.fao.org/3/y3557s/y3557s11.htm> (acceso 22 de agosto de 2019).

⁵ Eurofins Agrosience Services Group [Online] <https://www.eurofins.com/agrosienceservices> (acceso 23 de agosto de 2019)

Un factor que impulsa particularmente el mercado de los insecticidas a lo largo del tiempo es, por ejemplo, el desarrollo de resistencia a los insectos para productos químicos específicos (PNUMA, 2012)⁷. Un estudio de 2018 analizó la presencia de 76 plaguicidas en más de 300 suelos agrícolas llegando a la conclusión de que en Europa, el 83% de los suelos agrícolas se encuentran contaminados por uno o más plaguicidas.

La Figura 1 muestra las ventas totales de plaguicidas (en toneladas de ingredientes activos) en la UE durante el período 2011-2016, incluida la desagregación por grupo de plaguicidas. Como puede observarse, las ventas totales de plaguicidas para este período fueron relativamente constantes. Sin embargo, cabe señalar que la comparación del promedio de los últimos 3 años de la serie (2014-2016) con el promedio de los primeros 3 años de la serie (2011-2013) muestra un aumento en las ventas de plaguicidas de 5.6%. La Figura 1 también muestra que la venta de diferentes grupos de plaguicidas se mantuvo relativamente constante hasta 2015. Los cambios en 2016 pueden haber sido influenciados por la actualización de la lista de plaguicidas permitidos, que tuvo lugar en 2016.

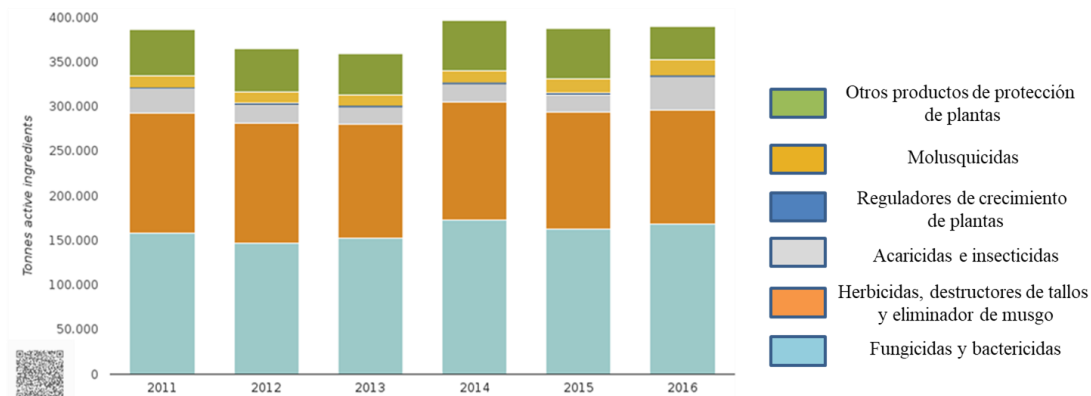


Figura 1. Venta total de plaguicidas en Europa

(Fuente: Agencia Europea del Medioambiente)

3.1. PRESENCIA DE PLAGUICIDAS EN AGUAS REGENERADAS

Desde la aprobación de la Ley de Aguas (1985)⁸, y la introducción de España en la UE, muchas de las medidas legislativas se han tenido que adaptar con el objetivo de proteger, en la medida de lo posible, los recursos hídricos existentes. El uso de forma mayoritaria de los plaguicidas en la agricultura, ha sido señalado como la causa principal de contaminación de las masas de agua. Parte del agua utilizada para el riego agrícola se infiltra y se filtra a través del suelo y el subsuelo. Con los años, se

⁶ Silva, V.; Mol, H. G. J.; Zomer, P.; Tienstra, M.; Ritsema, C. J.; Geissen, V. *Residuos de plaguicidas en suelos agrícolas europeos: una realidad oculta revelada*, Sci. Total Environ., **2018**, 653, 1532-1545.

⁷ Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 18-22 de febrero de 2012 [Online] <https://www.un.org/ruleoflaw/es/un-and-the-rule-of-law/united-nations-environment-programme/>

⁸ Ley de Aguas 29/1985, BOE nº189, 8 de agosto de 1985, sección 1, 25123-25135. [Online] <https://www.boe.es/eli/es/l/1985/08/02/29>. Derogada por el Real Decreto Legislativo 1/2001, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas [BOE nº 176, 2001, sección 1, 26791-26817].

ha llevado a cabo un gran esfuerzo en investigación, dirigido a identificar los plaguicidas de mayor riesgo, así como las prácticas de aplicación que pueden tener más probabilidades de contaminar el medioambiente, con la finalidad de prevenir la contaminación.

Sin embargo, lo cierto es que, a pesar de las mejoras en el proceso de evaluación de riesgos de plaguicidas y de las iniciativas de manejo de productos, y de la promoción de "mejores prácticas ambientales", los plaguicidas siguen llegando al agua en cantidades que, en algunas ocasiones, exceden las normas de calidad ambiental.

Así, en los últimos años, se ha prestado mucha atención al potencial de las diferentes tecnologías de tratamiento de aguas residuales para superar uno de los desafíos emergentes, como es la eliminación de contaminantes orgánicos, incluidos los plaguicidas, para su reutilización en prácticas agrícolas. Según datos científicos, el uso de tecnologías basadas en procesos de sedimentación, filtración o desinfección, como la cloración, la radiación UV y la ozonización, parece adecuado para el tratamiento de aguas residuales, la reutilización y su uso para el riego agrícola (Norton-Brandão et al., 2013)⁹.

Para la defensa de la calidad de estas aguas la UE está aplicando normas que exigen unos controles de seguridad del agua con el objetivo de tratar las aguas residuales y la gestión de las mismas. La contaminación de las aguas superficiales con plaguicidas se gestiona bajo la Directiva Marco del Agua, que requiere controles para reducir las emisiones, descargas y pérdidas de sustancias según la Directiva de Sustancias Prioritarias (Directiva 2000/60/CE)¹⁰.

- La Directiva de aguas subterráneas (UE, 2006)¹¹ establece una concentración máxima de plaguicidas en aguas subterráneas.
- Los Estados miembros también identifican y establecen estándares de calidad para contaminantes específicos de las cuencas fluviales en aguas superficiales y valores umbral en aguas subterráneas para sustancias que incluyen algunos plaguicidas individuales.
- La Directiva de Agua Potable (UE, 1998)¹² estipula una concentración máxima de 0.1 µg/l para cualquier plaguicida individual y sus metabolitos relevantes (hasta un máximo de 0.5 µg/l para plaguicidas totales) en agua potable. En 2013, el último año con información disponible, aproximadamente el 7% de las estaciones de agua potable subterránea reportaron niveles excesivos para uno o más de los 31 plaguicidas medidos y sus productos de degradación. En las estaciones de agua potable de río, hasta el 5% tuvo niveles excesivos en 2013 (Eurostat, 2013).

⁹ Norton- Brandão D., Scherrenberg S.M., Van Lier J. B.; *Reclamation of used urban waters for irrigation purposes*, **2013**, 1-14.

¹⁰ Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y Consejo, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, **2000**, 8-29.

¹¹ Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y Consejo, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro, **2006**, 1-13.

¹² Directiva 98/83/CE del Consejo, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, **1998**, 32-54.

En Europa, la contaminación del ciclo del agua por plaguicidas está vinculada con las fuentes puntuales y difusas que están básicamente relacionadas con las actividades agrícolas. Los niveles de concentración publicados en artículos científicos se encuentran en el rango de $\mu\text{g/L}$ a ng/L en las aguas residuales, e inferior al nivel de ng/L en las aguas superficiales o subterráneas (Martínez Bueno et al. 2012)¹³. La reducción drástica de las emisiones se logró con la adopción de medidas adecuadas, pero hoy en día, el uso de plaguicidas polares o semipolares, aún representa un gran problema en los países europeos.

Existen numerosos plaguicidas que se han prohibido a lo largo de los años, como el diazinón y clorpirifos, y se han sustituido por otros menos tóxicos o bien reformulados.

Con respecto al estado de la reutilización de aguas residuales en España, según el Libro Blanco del Agua (2000)¹³, se esperaba que el volumen de efluentes tratados alcanzara los $3.500 \text{ hm}^3/\text{año}$, una vez finalizado el Plan de Saneamiento y Tratamiento Nacional de acuerdo con la Directiva 91/271/CEE¹⁴. En 2005, se trataron 2.400 hm^3 de aguas residuales, de las cuales se reutilizó el 17% (Iglesias et al., 2005). Si bien el porcentaje de agua reutilizada con respecto a los recursos totales es pequeño (2,67%), este resulta esencial en zonas de España con déficits estructurales.

Recientemente, el Parlamento Europeo ha aprobado una nueva propuesta relativa a los requisitos para la reutilización del agua (2018/0169/COD)¹⁵. En esta propuesta se establecen los requisitos mínimos aplicables a las aguas regeneradas destinadas al riego agrícola. Su finalidad es llevar a cabo una evaluación de riesgos que cubra tanto los riesgos medioambientales como los riesgos para la salud humana y animal, teniendo en cuenta la naturaleza de los posibles peligros detectados. El uso del agua recuperada dependerá de su calidad. La extensión del tratamiento de aguas residuales determinará la calidad del agua recuperada, y su costo será variable dependiendo del tipo de tratamiento y la calidad deseada. Este costo también dependerá de las características iniciales de las aguas residuales recibidas por la planta.

La contaminación de los alimentos por compuestos químicos perjudiciales es una amenaza grave para la salud pública si no se identifica y controla debidamente. Es sabido por la literatura que las aguas residuales transportan una amplia gama de contaminantes, que, a través de la irrigación, pueden acumularse en el suelo, lo que dificulta su fertilidad y perturba las comunidades microbianas y, además, pueden ser

¹³ Dirección General de Obras Hidráulicas y Calidad de las Aguas; *Libro Blanco del Agua en España: Situación actual y los problemas existentes y visibles*, 2000, 5, 360-362 [Online] <http://www.cedex.es/NR/rdonlyres/7D08175D-29A4-40F9-AOCB-E70AB46EA8C9/126193/Indice.pdf> (acceso 23 de agosto de 2019)

¹⁴ Directiva 91/271/CEE del Consejo, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, 1991, 40-52. [Online] <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1991-80646> (acceso 24 de agosto de 2019)

¹⁵ Propuesta de reglamento del Parlamento Europeo y el Consejo relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua [Online] https://eur-lex.europa.eu/procedure/ES/2018_169

absorbidos por las plantas. Algunos estudios previos, han publicado datos sobre la acumulación de metales en el suelo después del riego con agua regenerada¹⁶¹⁷.

Otros contaminantes orgánicos, como plaguicidas, transportados por las aguas residuales, también pueden acumularse en los suelos debido a la irrigación. Estos compuestos aumentan la toxicidad del suelo y representar un riesgo ecológico potencial en el ecosistema del suelo¹⁸.

3.2. IMPACTO DE USO DE AGUAS REGENERADAS EN SUELO

El uso de aguas regeneradas en el riego de cultivos en zonas costeras ha sido cuestionado al presentar desventajas frente a las aguas subterráneas habituales, como:

- La depuración necesaria para cumplir con el Real Decreto 1620/2007¹⁹, el cual es muy exigente, por lo que el precio de salida del agua se encarece bastante, dependiendo así de las características iniciales del agua y del coste del agua alternativa con la que se compara²⁰.

- Las aguas regeneradas pueden degradar químicamente el suelo gracias a su elevada concentración salina y a su contenido de metales pesados en disolución. Sin embargo, esta presencia dependerá del origen del agua residual y, en concreto, en las zonas costeras andaluzas. Por lo que respecta a la salinidad, estudios realizados por el IFAPA en Almería, demuestran su viabilidad en un cultivo de judía verde²¹ (Segura et al., 2003)²¹.

3.2.1. Adsorción de plaguicidas al suelo

Tras la aplicación de los plaguicidas, estos llegan en general al suelo, ya sea directa o indirectamente, pudiendo originar problemas de contaminación. El suelo es capaz de adsorber las moléculas de los plaguicidas de manera que modifica las propiedades de dichos compuestos, tales como su actividad química, su persistencia y por tanto la degradación²².

- Los plaguicidas pueden sufrir una inactivación química al quedarse bloqueados. Debido a esto, hay que tener en cuenta el tipo de suelo en el momento de aplicar los

¹⁶ Tan, K., Wang, H., Chen, L., Du, Q., Du, P., Pan, C.; *Estimation of the spatial distribution of heavy metal in agricultural soils using airborne hyperspectral imaging and random forest*, J. Hazard. Mater., **2019**, 382, 120987.

¹⁷ Sharma, R.; Yadav, A.; Ramteke, S.; Patel, K.S.; Lata, L.; Milosh, H.; Corns, W.T.; Martín-Ramos, P.; *Heavy metal pollution in surface soil of Korba Basin, India*, J. Hazard. Mater., **2019**, 23(4), 05019004.

¹⁸ Müller, K.; Magesan, G.N.; Bolan, N.S.; *A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil*, Agric., Ecosyst. Environ. **2007**, 120, 93-116.

¹⁹ Real Decreto 1620/2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, BOE nº294, **2007**, 1-4.

²⁰ Baeza Cano R., Segura Pérez M. L.; *Utilización de aguas residuales regeneradas en el riego de cultivos: una necesidad y una solución*, **2007**, 1-4.

²¹ Segura Pérez, M.L., Contreras París, J.I., Granados, M.R., Martín Expósito, E.; *Utilización de agua residual depurada en fertirrigación de cultivos hortícolas*, 2003, 1-9.

²² Sánchez Martín, M. J., Sánchez Camazano, M.; *Los plaguicidas: Adsorción y evolución en el suelo*, **1984**, 32-33.

plaguicidas, a fin de determinar la cantidad que habría que añadir para que tuviese el efecto apropiado. Un ejemplo sería un suelo arcilloso que adsorbe en gran cantidad los plaguicidas, por lo que habría que añadir más plaguicida²².

- La persistencia de los plaguicidas aumenta cuando se encuentran adsorbidos en el suelo. Algunas veces, si la adsorción es irreversible, la actividad del biocida se pierde de forma definitiva, provocando que la degradación se detenga totalmente. Sin embargo, en muchos casos, con el simple cambio de las condiciones ambientales, la adsorción puede invertirse y liberar a los plaguicidas²².

- Hay otros casos donde el suelo acelera la degradación de estos compuestos, mediante catálisis de reacciones de descomposición. Un ejemplo sería el suelo de arcilla, que cataliza la descomposición mediante la formación de enlaces arcilla-molécula orgánica que debilitarán ciertos enlaces intramoleculares²².

3.2.2. Factores que afectan a la adsorción, desorción y movimiento de plaguicidas en suelo

Las propiedades químicas y físicas de los suelos están fuertemente influenciadas por los componentes del suelo que tienen superficies altamente específicas o superficies altamente reactivas. Dado que la superficie específica alta se asocia con un tamaño de partícula pequeño, la fracción coloidal del suelo será el factor dominante para influir en las interacciones entre las moléculas de plaguicidas y el suelo. Los constituyentes coloidales de los suelos se pueden dividir en la fracción orgánica y la fracción mineral²³.

La fracción mineral está compuesta de minerales de arcilla cristalina y óxidos e hidróxidos cristalinos y amorfos, con un tamaño de partículas inferior a dos micras. Constituyen la fracción coloidal inorgánica del suelo y su carga eléctrica superficial les permite adherirse a compuestos ionizados de forma opuesta. Es gracias a esto que la fracción mineral tiene su importancia en los fenómenos de adsorción de las sustancias que llegan al suelo^{23 24}.

La fracción coloidal orgánica o húmica no se ha caracterizado por completo, pero parece que gran parte de la reactividad de esta fracción está incorporada en la fracción denominada "ácido húmico".

El ácido húmico fue descrito por Van Dijk en 1966 como un polímero condensado globular, polidisperso e irregular. Los ácidos húmicos son ácidos polibásicos con al menos dos clases de grupos ácidos. La capacidad de intercambio catiónico del ácido húmico es mayor que la de los minerales arcillosos, del orden de 2 a 4 meq/g. Grupos funcionales como carboxilo, amino, hidroxilo fenólico e hidroxilo alcohólico, además de afectar directamente la adsorción de plaguicidas catiónicos y aniónicos

²³ Bailey, G. W.; White, J. L.; *Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil*, Rev. Environ. Contam. Toxicol.; **1970**, 32, 40-43.

²⁴ Sánchez Martín, M. J., Sánchez Camazano, M.; *Los plaguicidas: Adsorción y evolución en el suelo*, **1984**, 40-49.

por el ácido húmico, también pueden proporcionar sitios para interacciones de enlaces de hidrógeno con las moléculas del plaguicida²⁵.

Debido a la gran complejidad del ácido húmico y las dificultades experimentales en la aplicación de técnicas espectroscópicas al estudio de las interacciones entre dos grupos de compuestos orgánicos de considerable complejidad, se dispone de relativamente poca información sobre el mecanismo de adsorción de plaguicidas por la materia orgánica²⁵

Las propiedades del adsorbente que influyen en su propio comportamiento en las interacciones con el adsorbato están relacionadas con el área y la configuración de la superficie, además de con la magnitud, la distribución e intensidad del campo eléctrico en la superficie. Dado que las reacciones de adsorción implican interacciones en las superficies, una de las propiedades más importantes de los adsorbentes es su área superficial.

En resumen, la extensión de la adsorción es lo suficientemente grande como para poder medirla fácilmente y, en muchos casos, se pueden observar los espectros de las moléculas adsorbidas^{26 27}.

3.2.3. Evolución de plaguicidas en suelo

Al aplicar un plaguicida, bien en forma de pulverización o líquido, este se distribuye a todas las fases ambientales, es decir, suelo, plantas, aire, animales, etc. Dicha distribución tiene lugar de acuerdo a las propiedades químicas de cada fase²⁸.

El estudio de la interacción de los plaguicidas con el suelo posee un gran interés, debido a que la mayor parte de los mismos entran en contacto con la superficie del suelo tanto directa como indirectamente, por lo que es necesario conocer su evolución en este sistema²⁹. Los mecanismos que influyen en la persistencia y evolución de plaguicidas en el suelo están esquematizados en la figura 2.

²⁵ Bailey, G. W.; White, J. L.; *Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil*, Rev. Environ. Contam. Toxicol.; **1970**, 32, 31-32.

²⁶ Bailey, G. W.; White, J. L.; *Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil*, Rev. Environ. Contam. Toxicol.; **1970**, 32, 73-77.

²⁷ Lozano García, M. S.; *Estudios de adsorbentes arcillosos para una aplicación sostenible*, Universidad de Salamanca, Salamanca, **2016**, 28-31.

²⁸ Bailey, G. W.; White, J. L.; *Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil*, Rev. Environ. Contam. Toxicol.; **1970**, 32, 27-31.

²⁹ López Geta, J. A.; Martínez Navarrete, C.; Moreno Merino, L.; Navarrete Martínez, P.; *Las aguas subterráneas y los plaguicidas, Movimiento de los plaguicidas hacia las aguas subterráneas*, **1992**, 27-31.

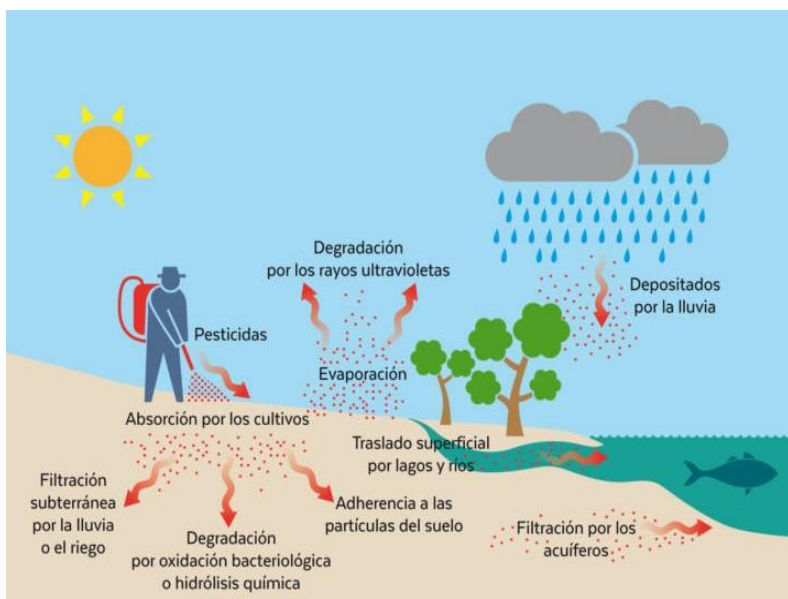


Figura 2 . Evolución de plaguicidas en suelo

(Fuente Revista N°96 *Ecologistas en acción*³⁰)

Estos mecanismos son capaces de actuar solos o bien combinándose sobre una estructura de uno o más productos específicos, y estos dependen de factores ambientales como la temperatura, la humedad, la materia orgánica, pH del suelo, tipo de arcilla, etc. La descomposición de los plaguicidas puede tener lugar de 3 maneras:

- Descomposición química: Una descomposición química puede tener lugar por diversos procesos, los cuáles son oxidación-reducción, hidroxilación, dialquilación, rotura de anillos, hidrólisis e hidratación.²⁸

- Descomposición fotoquímica: Descomposición producida por efecto de la luz ultravioleta proveniente de la luz solar. Las fuentes de luz y su intensidad regulan el grado de descomposición de un compuesto²⁸.

- Descomposición microbiana: Los microorganismos del suelo (bacterias, hongos, etc) descomponen los plaguicidas para obtener alimento y energía con el objetivo de su crecimiento²⁸.

3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA EVALUACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS AMBIENTALES

El análisis de contaminantes orgánicos en muestras ambientales (agua, suelo) requiere de su identificación y cuantificación en muestras, a menudo, con matrices complejas, y a niveles muy bajos, de ultra traza. Por lo tanto, las técnicas analíticas tienen que ser específicas para la detección de los analitos entre una gran mayoría de otros compuestos y ser lo suficientemente sensibles para permitir alcanzar bajos niveles de cuantificación.

³⁰ Romano, D; *Ríos plagados de plaguicidas*, *Ecolog. Acción*, 2018.

El análisis de plaguicidas, puede ser una tarea difícil ya que muchos son polares, tienen bajos pesos moleculares o son sensibles a la temperatura. Por consiguiente, para la correcta cuantificación de este tipo de sustancias en matrices medioambientales se necesitan técnicas analíticas avanzadas, como la cromatografía gaseosa o líquida y la espectrometría de masas. El desarrollo de estas técnicas ha permitido su determinación por debajo del nivel de ng/L, haciendo posible la detección de la presencia, la distribución y el destino de estos compuestos en los diferentes compartimentos medioambientales³¹.

3.3.1. Tratamiento de muestras ambientales

No existe una técnica de preparación de muestras universal para todo tipo de muestras y esta dependerá de la naturaleza de los analitos, la matriz, y el método de análisis final. Por lo tanto, la selección y optimización del procedimiento de preparación de muestras será un factor clave en el éxito final del análisis. Así, la elección de un procedimiento adecuado influirá ampliamente en la fiabilidad y la precisión del análisis y por tanto en los resultados. Minimizar el número de pasos de preparación y tratamiento de la muestra es muy importante y es eficaz no sólo en la reducción de las fuentes de error, sino también para ahorrar tiempo de operación y costes.

- Extracción líquido-líquido (LLE)

Esta extracción consiste en la separación de dos líquidos distintos inmiscibles entre sí, o parcialmente inmiscibles, con el objetivo de separar compuestos de interés de los demás componentes. Esta técnica es una de las más utilizadas para la separación de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, como por ejemplo para analizar trazas de plaguicidas en sistemas acuáticos para evaluar el riesgo de contaminación (Mondal et al., 2018)³², o bien ácidos en disoluciones acuosas (Franco et al., 2019)³³. Generalmente este tipo de extracción se utiliza en general para extraer moléculas orgánicas (Farajzadeh and Khoshmaram, 2014)³⁴.

- Extracción sólido-líquido (SPE)

Es una técnica de extracción en la que se hace pasar una disolución a través de un sólido poroso arrastrando compuestos de interés analítico. La extracción en fase sólida (SPE) permite: (i) extraer, (ii) concentrar, (iii) purificar y (iv) cambiar el disolvente.

³¹ Pitarch Arquimbau, M. E.; *Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas*, **2001**, 36-53.

³² Mondal, R.; Mukherjee, A.; Biswas, S.; Kole, R.; *GC-MS/MS determination and ecological risk assessment of pesticides in aquatic system: A case study in Hooghly River basin in West Bengal, India; Chemosphere*, **2018**, 206, 217-230.

³³ Franco, E.; Pádua, V.; Rodriguez, M.; Silva, D.; Libânio, M.; Pereira, M.; Silva, P.; Santanta Júnior, I.; Rocha, B.; Camargo, J., Mourão, A.; Rodrigues, J.; *A simple liquid-liquid extraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of haloacetic acids in environmental samples: Application in water with Microcystis aeruginosa cells; Microchem. J.*, **2019**, 150, 104088.

³⁴ Farajzadeh, M.; Khoshmaram, L.; *A Rapid and Sensitive Method for the Analysis of Pyrethroid Pesticides Using the Combination of Liquid-Liquid Extraction and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. CLEAN - Soil, Air, Water*, **2014**, 43(1), 51-58.

Un ejemplo muy usado de este tipo de extracción es el de separar distintos plaguicidas de muestras acuosas junto a un método de análisis concreto (Wang et al., 2019)³⁵.

- Método QuEChERS

El método de extracción en fase dispersiva QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) fue originalmente utilizado para el análisis de plaguicidas en alimentos. Sin embargo, hoy en día se utiliza también para el análisis multiresiduo de distintos compuestos (plaguicidas, antibióticos, fármacos, etc.) en distintas matrices sólidas, como en el caso de la extracción de plaguicidas en suelo de arrozales³⁶.

Este método se llevó a cabo originalmente con alimentos como frutas y hortalizas, que contenían un alto porcentaje de agua. El método utilizaba el tratamiento con acetonitrilo como disolvente seguido de una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE-QuEChERS). Utilizaba como adsorbente sulfato de magnesio para eliminar posibles trazas de agua presente.

Con el paso del tiempo, este método ha ido sufriendo modificaciones que mejoraron el método para el análisis de cada vez más analitos en matrices diferentes o consideradas difíciles³⁷.

Una importante modificación del método fue la adición de un tampón a la etapa inicial para una mejor extracción de analitos ácidos/básicos. Esencialmente hubo dos modificaciones en cuanto al tampón se refiere. El primero de ellos fue el uso del tampón de acetato, que proporcionaba un pH de 4.8, publicado por la AOAC como el método oficial 2007.01³⁸. El segundo cambio fue el uso de un tampón citrato, que ofrecía un pH entre 5 y 5.5, publicado como Método Estándar EN 15662 del CEN (Comité Europeo de Normalización)³⁹. Este último tampón se obtiene añadiendo sales de citrato trisódico dihidratado y dihidrogenocitrato disódico sesquihidratado. Estas sales mantienen el pH estable y evitan así posibles degradaciones de los analitos e inducen la partición de los mismos.

3.3.2. Técnicas de análisis

Para la determinación cuantitativa de plaguicidas en muestras ambientales, se utilizan técnicas cromatográficas que separan cada analito de la matriz compleja que

³⁵ Wang, X., Jia, R., Song, Y., Wang, M., Zhao, Q. and Sun, S.; *Determination of pesticides and their degradation products in water samples by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry*. *Microchem. J.*, **2019**, *149*, 104013.

³⁶ Caldas S. S.; Bolzan C. M.; Cerqueira M. B.; Tomasini D.; Furlong E. B.; Fagundes C.; Primel E.G.; *Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS/MS*, *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, *59*, 11918-11926.

³⁷ Anastassiades M.; Lehota S. J.; *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce*, *J. AOAC Int.*, **2003**, *86*, 412-431.

³⁸ Método oficial AOAC 2007.01: *Residuos de Pesticida en Comida por extracción con Acetonitrilo y separación con sulfato de Magnesio*, **2007**, 1-9.

³⁹ UNE-EN 15662:2019; *Método múltiple para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal mediante análisis basados en GC y LC tras extracción con acetonitrilo y limpieza mediante SPE por dispersión (Método QuEChERS)*, **2019**, 1-4.

constituye la muestra. La cromatografía gaseosa (GC) se puede aplicar directamente a compuestos con una elevada volatilidad, pero en el caso de los compuestos polares y semi-polares, es preferible analizarlos por cromatografía líquida (LC). Dentro de los posibles sistemas de detección existentes para GC o LC, la espectrometría de masas (MS) es, en ambos casos, el método más frecuentemente elegido para el análisis de este tipo de sustancias. La MS es altamente selectiva y sensible, proporciona información estructural y del peso molecular y se puede usar para la identificación de compuestos orgánicos, en función de cual sea el rango de masas del instrumento analítico. En matrices complejas, la MS es generalmente la única técnica de cuantificación aplicada para la determinación simultánea de una gran variedad de contaminantes presentes a bajas concentraciones. La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) proporciona información estructural detallada, y, en muchos casos es esencial para disponer de la sensibilidad y selectividad necesaria para el análisis de concentraciones traza de este tipo de contaminantes orgánicos (Bueno et al., 2012)⁴⁰.

- Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos (LC) utiliza como fase móvil un líquido. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica de separación más utilizada debido a la posibilidad de combinar distintas fases móviles con propiedades diferentes, con diversas fases estacionarias y detectores, pudiendo ser aplicable en muchos campos de la ciencia. Es idónea para el análisis de moléculas térmicamente sensibles, no volátiles y polares. Entre las principales ventajas de la técnica LC se encuentran la selectividad, la introducción directa de muestras acuosas y el poder de elución de la fase móvil⁴¹.

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) es una de las técnicas más utilizadas para analizar muestras de plaguicidas, tanto en suelo como en muestras de agua de riego, ya que la técnica de LC es excelente para separar los compuestos en función de su polaridad, y si esta técnica se combina con la espectrometría de masas, que ofrece una gran sensibilidad y precisión, el resultado del análisis es muy preciso.

Es posible encontrar diferentes clasificaciones de métodos de LC, en función de:

- (i) la forma física de la fase estacionaria (cromatografía en columna, cromatografía en capa fina y cromatografía capilar)
- (ii) el movimiento de la fase móvil (cromatografía ascendente o descendente)
- (iii) la eficiencia de la separación, (cromatografía en capa fina de alta resolución o la cromatografía líquida de alta resolución-HPLC)
- (iv) la interacción que se produce entre la fase estacionaria y los analitos que se encuentran en el eluyente.

⁴⁰ Bueno, M.; Gomez, M.; Herrera, S.; Hernando, M.; Agüera, A; Fernández-Alba, A.; *Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring; Environ. Pollut.*, **2012**, *164*, 267-273.

⁴¹ Niessen, Wilfried M.A.; *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3^{era} ed.; Taylor and Francis, **2006**.

De todas las clasificaciones anteriores, cabe destacar por su aplicación en el campo del análisis de plaguicidas, la última de ellas (iv), que se centra en el tipo general de interacción que se produce entre la fase estacionaria y los solutos que se encuentran en el eluyente. Así es posible diferenciar entre tres tipos de interacciones: fase normal, fase reversa y de intercambio iónico.

1) Fase normal: En las cromatografías de fase normal, la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, es decir, los enlaces de la fase estacionaria tienen momentos dipolares mayores que los enlaces de la fase móvil. Debido a que la fase estacionaria, generalmente, es un polímero inorgánico poroso, cuyo material suele ser gel de sílice o alúmina, la actividad de dicho polímero depende de la densidad de los grupos hidroxilo en la superficie y de la forma química que tengan. Ya que el enlace Si-O no estaba protegido, se producía una pérdida de fase estacionaria por disolverse en la fase móvil (efecto sangrado). Por ello dejó de usarse.

2) Fase reversa: En este tipo de cromatografías la fase estacionaria es apolar, donde el enlace Si-O se encuentra protegido por una cadena apolar enlazada al átomo de oxígeno. Los grupos orgánicos más usados para proteger son el grupo $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ y $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, siendo este último el más usado. Estos grupos orgánicos, además de recubrir la pared del polímero, son capaces de interactuar con moléculas apolares que se encuentren en la fase móvil, favoreciendo la separación cromatográfica. Por otro lado, en ocasiones se utiliza como fase estacionaria una resina de poliestireno y divinilbenceno. El divinilbenceno forma enlaces cruzados entre cadenas de poliestireno, generando una gran rigidez capaz de soportar grandes presiones.

Por último, este tipo de cromatografía ofrece picos más finos y simétricos, mientras que las reacciones de adsorción/desorción tienden a ser rápidas.

3) Intercambio iónico: La cromatografía de líquidos de intercambio iónico tiene como fase estacionaria una resina con carga electrónica, ya sea negativa o positiva, denominada resina de intercambio iónico. Reciben este nombre debido a que los iones del soporte de resina se asocian con los iones de signo opuesto de la fase móvil. El intercambio de iones, a pesar de que puede parecer sencillo, es bastante complicado debido a que se ha verificado la existencia de reacciones químicas competitivas en las que participan todas las especies iónicas de la solución y de la resina. Afortunadamente, la fuerza de las interacciones de los distintos analitos de la fase estacionaria es proporcional al promedio de carga por cada ácido-base que participa.

- Instrumentación de equipo HPLC

Los equipos de HPLC son bastante complejos de diseñar debido a que tienen que soportar grandes presiones y, por ello, son caros. Estos equipos tienen componentes con funciones específicas:

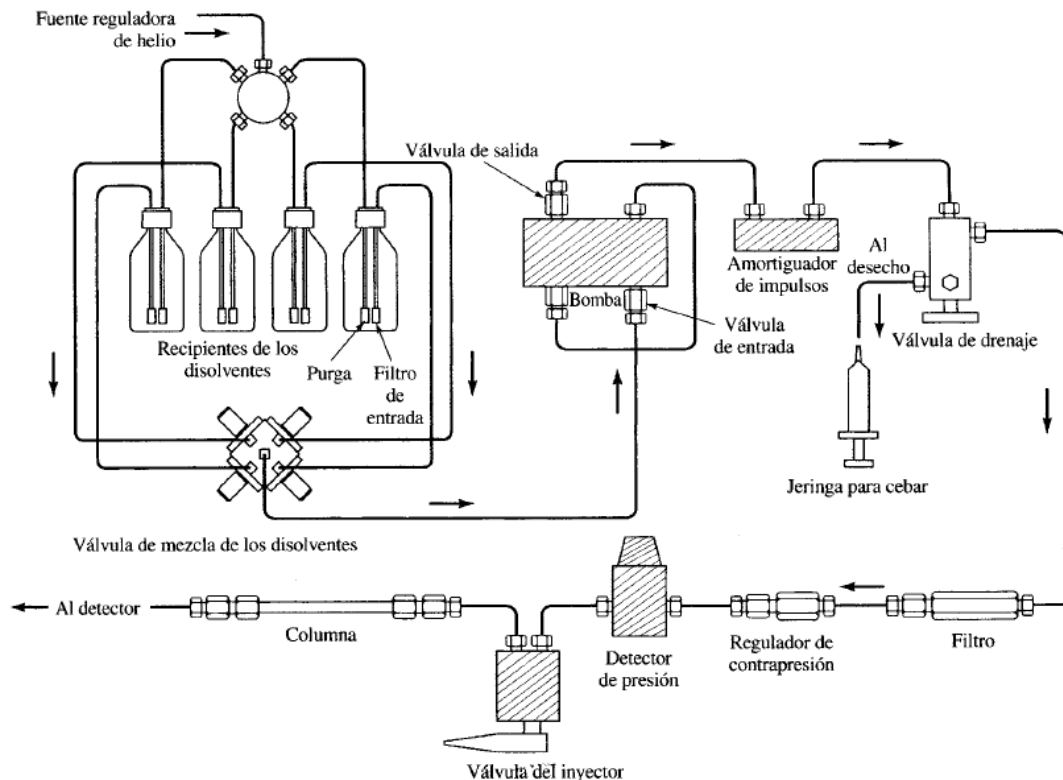


Figura 3. Esquema Equipo HPLC

(Fuente: *Principios de Análisis Instrumental 5ª edición*⁴²)

1) Recipientes de fase móvil: Un equipo de HPLC suele estar equipado por 2 o más recipientes de vidrio o acero inoxidable. Esto se debe a que, generalmente, se utiliza una mezcla de estas disoluciones con polaridades distintas, para obtener una fase móvil con la polaridad adecuada para la cromatografía. Para evitar la posible entrada de aire al sistema en forma de burbujas, y afectando al detector, los recipientes vienen equipados de un sistema, como un desgasificador o una bomba de vacío, que elimina posibles burbujas de aire mediante finas burbujas de un gas inerte. Algunas veces se realiza una separación en gradiente, lo que conlleva una variación en % de los disolventes, de forma programada, conforme avanza la cromatografía. Para ello se utiliza una válvula de mezcla de disolventes, que, mediante un programa, regula los porcentajes de los disolventes cada cierto tiempo, el cual se programa.

2) Sistema de bombeo: Los requisitos para un sistema de bombeo son muy rigurosos, incluyendo la generación de presiones por encima de 6000 psi, un flujo sin pulsaciones, con un intervalo de caudales de 0,1 a 10 mL/min, junto con el control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo, y estar fabricado de componentes resistentes a la corrosión. Existen 3 tipos de bombas, las cuales son bombas de desplazamiento, neumáticas y recíprocas, siendo esta última la más utilizada.

3) Sistema de inyección: El factor que limita la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. Si a esto se le añade el ensanchamiento de bandas, la

⁴² Skoog, D., Nieman, T. and Holler, F.; *Principios de análisis instrumental*; 5ª ed. McGraw Hill, 2001.

limitación es mayor. Para resolver este problema es conveniente utilizar volúmenes pequeños e introducirlos sin despresurizar el sistema. El inyector más usado utiliza bucles de muestra, que le permite introducir muestras con presiones de hasta 7000 psi.

4) Columna cromatográfica: La columna es el corazón del equipo de HPLC. Suelen estar constituidas como un tubo de acero inoxidable, con diferente tamaño y de la fase estacionaria sólida. Recientemente se han empezado a fabricar columnas con dimensiones inferiores a 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, con diámetro de poro 50-150 Å y partículas esféricas de 2 o 5 µm. Por lo general las columnas llevan instalados un termostato, para obtener mejores cromatogramas, y una pre-columna, la cual tiene la función de aguantar el golpe de presión al pasar la fase móvil, y proteger la columna. La columna posee un relleno polimérico poroso, el cual se encarga de la separación cromatográfica de los analitos que provienen de la fase móvil⁴².

5) Detector: El detector analiza la disolución que sale de la columna cromatográfica, y la convierte en una señal eléctrica que envía al ordenador. Debe poseer una adecuada sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad, además de tener una respuesta lineal para los analitos, fiabilidad y un tiempo de respuesta corto. No debe destruir la muestra. Existen diversos detectores como, por ejemplo, ultravioleta (UV), fluorescencia, diodos-array (DAD) o espectrometría de masas (MS), siendo esta último el más común.

3.3.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica cuantitativa/cualitativa que se emplea para obtener información de la masa molecular del compuesto analizado, así como obtener información estructural del mismo o, simplemente, detectar su presencia y/o cuantificar su concentración. De forma general, en la espectrometría de masas, las moléculas ionizadas o sus fragmentos se separan de acuerdo con su relación masa carga (m/z) por efecto de la aplicación de campos eléctricos y/o magnéticos. Para ello son capaces de generar moléculas en fase gaseosa, ionizarlas y separarlas en función de su masa carga (m/z)^{42,43}.

Las investigaciones en el acoplamiento de LC con MS empezaron a principios de los años 70. En los primeros 20 años, la mayor parte de la atención se centró en resolver los problemas con las interfases y en el desarrollo de nuevas tecnologías. Las nuevas interfases a presión atmosférica (API) han sido la clave de este desarrollo. La API es una técnica de ionización “blanda” que, actuando a presión atmosférica y no a alto vacío como es habitual en otras técnicas, obtiene un alto rendimiento de producción de iones. Es una técnica versátil y robusta, por lo que estas interfases se han convertido en las más ampliamente utilizadas en diversas áreas. La tecnología API, incluye las interfases comúnmente llamadas “electrospray” (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI)⁴⁴.

⁴³ Egea Mellado, J. M.; *Curso “Online” de cribado neonatal: Tema 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)*, **2018**, 1-11.

⁴⁴ Martín Gómez, M. C.; Ballesteros González, M.; *Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores*; Real Academia Nacional De Farmacia, **2010**, 113-168.

- Características

Cualquier espectrómetro de masas debe tener cuatro características fundamentales: un sistema para introducir la sustancia que se desea analizar en el instrumento, un sistema de ionización, un acelerador que dirija los iones hacia el detector y un sistema para separar los distintos iones analizados mediante la relación masa/carga, y registrar el espectro de masas de la sustancia.

- Instrumentación

1) Sistema de introducción de muestras: El objetivo del sistema de entrada es la introducción de la muestra en la fuente de iones evitando la mínima pérdida de vacío. Este sistema depende de la volatilidad y naturaleza de la muestra, y del método de ionización. Hoy en día los espectrómetros de masas llevan equipados tres tipos de sistemas de entrada, aunque los más empleados en la actualidad son los sistemas de entrada por sonda directa. Estos sistemas introducen las muestras líquidas en una cámara intermedia de vacío, hacia el espectrómetro de masas.

2) Fuente de iones: La fuente iones convierte los componentes de la muestra en iones mediante un bombardeo de fotones, electrones, iones o moléculas. También se puede ionizar por energía térmica y eléctrica. En muchos casos la fuente de iones está combinada con el sistema de entrada, dando el mismo resultado, es decir, un haz de iones, generalmente positivos, que posteriormente son acelerados hasta llegar al analizador de masas. Si los compuestos a analizar son volátiles, el método de ionización suele ser por impacto electrónico o por ionización química, mientras que si se trata de compuestos no volátiles, la técnica de ionización más utilizada es electrospray.

3) Analizador: El analizador tiene la función de analizar la dispersión de los iones mediante la relación carga/masa. Es la parte esencial del espectrómetro de masas, de la que depende la sensibilidad, resolución, rango de masas, etc. La dispersión iónica se consigue aplicando campos magnéticos o eléctricos que desvían los iones en función de su masa, masa/carga o de su energía.

Existen muchos tipos de analizadores, como el analizador de tiempos de vuelo (TOF), el Orbitrap, o el analizador de triple cuadrupolo, siendo este último el más usado en los últimos años para la determinación de plaguicidas en muestras ambientales y alimentos por su sensibilidad, robustez y coste económico.

- Métodos de ionización

Para el acoplamiento del espectrómetro de masas con el cromatógrafo de líquidos se requiere de una interfase (que se encarga de modificar el estado de los analitos para su análisis), ya que las condiciones de temperatura y presión son distintas en LC y en MS. LC requiere de altas presiones, mientras que MS requiere de un alto vacío y altas temperaturas.

Existen numerosas interfases, las cuales están clasificadas como técnicas de ionización blandas (ESI, APCI, APPI) y duras. Las técnicas de ionización blandas no producen una gran fragmentación del analito, por lo que es recomendable el uso de analizadores de masa de alta resolución, como el TOF o el Orbitrap.

En este experimento se utilizó una interfase a presión atmosférica denominada ESI (Electro-Spray Ionization).

Esta interfase se desarrolló en un experimento por primera vez en 1984 con John B. Fenn y M. Yamashita.

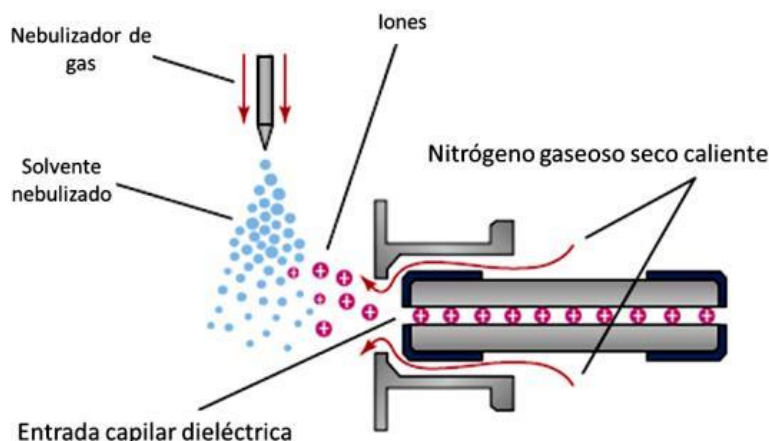


Figura 4. Ionización por electro-spray
(Fuente Agilent Technologies 2001)

En esta ionización, se aplica una tensión de 3000-6000 voltios, que minimiza el tamaño de gota de muestra llegando a formar una forma cónica, conocida como cono de Taylor. En este momento, las gotas del aerosol poseen una gran carga eléctrica, que provoca un aumento de las fuerzas coulombianas, de tal forma que, tras superar la tensión superficial del disolvente, se produce una súbita evaporación iónica de los analitos, facilitando así la eliminación del disolvente. En este momento se suele pasar una corriente de nitrógeno para desolvatar los analitos con facilidad.

Tras la evaporación iónica, los iones se desplazan gracias a una diferencia de potencial entre el capilar y el cono de entrada, eliminando así moléculas neutras y otras interferencias.

La ionización por electrospray tiene la ventaja de poder trabajar con iones tanto positivos como negativos. La fuente de ionización, además de depender del tipo de analitos que se quieren estudiar, requiere de otros parámetros:

1) Voltaje de ionización: Debe haber un regulador del voltaje responsable de ionizar la muestra, y depende de la polaridad de los analitos, y afectará a la sensibilidad.

2) Gas de nebulización: Es un gas responsable de crear el spray, por lo que influirá en la sensibilidad del análisis y la estabilidad del spray.

3) Temperatura: Esta variable es fundamental para la correcta evaporación de los analitos de la muestra y la eliminación previa del disolvente.

- Analizador Triple Cuadrupolo

Los analizadores cuadrupolo constan de cuatro cilindros paralelos entre sí que actúan a modo de electrodos. Estas barras se encuentran conectadas eléctricamente, mientras se les aplican potenciales variables de corriente alterna, provocando la aceleración de los iones y un incremento simultáneo de la tensión de corriente. Gracias a este aumento, se consigue desviar los iones de una relación m/z que no interesa y, por tanto, conseguir aislar los analitos de interés.

El analizador de triple cuadrupolo se divide en tres partes principales, cada una con una función determinada. El primer cuadrupolo selecciona el ion precursor que se desea analizar, mediante el uso de voltajes variables y de radiofrecuencia. Tras seleccionar el ion precursor, este llega al segundo cuadrupolo, donde se fragmentará mediante el uso de un gas de colisión.

Este segundo cilindro se denomina celda de colisión, en el cual se introduce una pequeña cantidad de gas de ionización, como He y Ar, con el objetivo de que los iones colisionen entre sí y se fragmenten en iones secundarios, que posteriormente se separan en el tercer cuadrupolo. Esto quiere decir que, mientras los cilindros Q1 y Q3 se utilizan como filtros de masas, el segundo cilindro se utiliza para fragmentar la molécula ionizada.

Por último, se analizan los fragmentos obtenidos del ion precursor. Esta técnica tiene una elevada sensibilidad y especificidad. Minimiza el efecto matriz y el ruido químico, además de proporcionar una cuantificación precisa y reproducible.

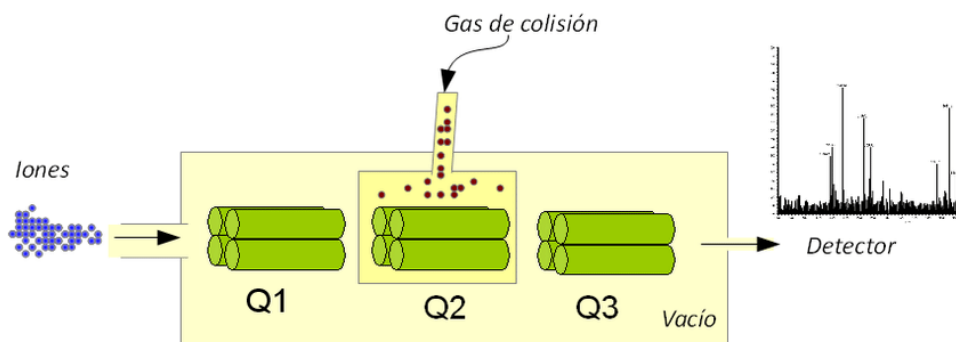


Figura 5. Funcionamiento Analizador QqQ
(Fuente Tesis Sanchez et al)⁴⁵.

El resultado de combinar los cuadrupolos Q1 y Q3 da como resultado el poder seleccionar hasta cuatro modos de trabajo diferentes:

- Multiple Reaction Monitoring (MRM): Ambos cuadrupolos trabajan en modo SIM. El modo SIM consiste en una monitorización selectiva de iones característicos de los compuestos presentes en la muestra.

⁴⁵ Sánchez-Guijo, Alberto; *Determinación de corticoides en orina mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem*, 2013, 19-34.

Este modo se utiliza para el análisis cuantitativo de trazas de compuestos conocidos (Colazzo et al., 2018)⁴⁶, ya que se detectan de forma específica cada uno de los compuestos de interés eligiendo correctamente el ion en Q1 y en Q3. Aunque este doble filtrado reduce el nivel de ruido en buena medida, siempre existe la posibilidad de que un elevado ruido de fondo o las señales de la matriz interfieran con el analito buscado. Este es el modo de trabajo seleccionado para este experimento.

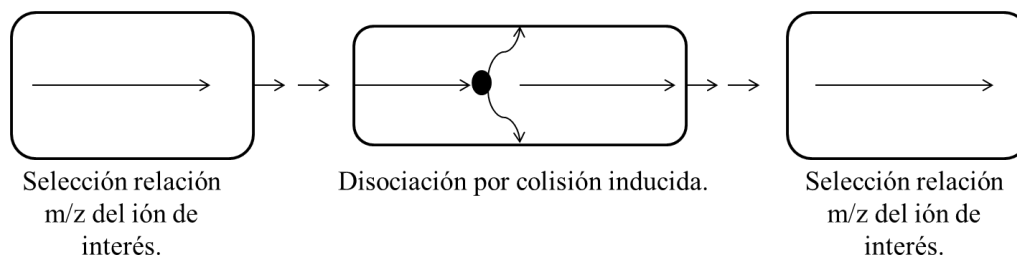


Figura6. Funcionamiento del modo MRM

- Neutral Lost Scan: Los cuadrupolos Q1 y Q3 trabajan en modo SCAN, para así detectar analitos que al fragmentarse produjeron moléculas neutras y que, por tanto, no son afectadas por la tensión de corriente y no llegan al Q3⁴³.

- Precursor Ion Scan: Este modo de trabajo híbrido consiste en utilizar el cilindro Q1 en modo SCAN mientras que el Q3 trabaja en modo SIM.

De esta manera es posible detectar analitos que generan un mismo fragmento tras su paso por la celda de colisión⁴³.

- Product Ion Scan: Este último modo de trabajo funciona a la inversa que el PIS. Aquí el Q1 está en modo SIM y el Q3 en modo Scan. Esta modalidad es utilizada principalmente para la puesta a punto de los métodos para la determinación de los analitos de interés⁴³.

4) **Detector**: Los detectores son aquellos dispositivos capaces de convertir el haz de iones en una respuesta eléctrica proporcional que se enviará al ordenador para ser procesada y tratada, en base a la carga, masa o velocidad de los iones secundarios recibidos. Deben tener una alta eficiencia, pues cuanto más baja sea la concentración de analito, más impreciso es el resultado obtenido. A continuación, se explican 3 tipos de detectores:

- Copa de Faraday: Este tipo de detectores es el más simple. Tiene una baja sensibilidad y respuesta lenta.

- Canales electromultiplicadores: Este detector consiste en calcular la energía cinética de los iones, producida en el impacto de los iones en la pared del detector.

⁴⁶ Colazzo, M.; Pareja, L.; Cesio, M.; Heinzen, H; *Multi-residue method for trace pesticide analysis in soils by LC-QQQ-MS/MS and its application to real samples*; *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2018**, *98*, 1292-1308.

Los dínodos que forman este detector liberan electrones al recibir el choque de los iones, de manera que se genera una corriente eléctrica que llega al ordenador.

- Detector de iones electro-óptico: Este último detector convierte el impacto de los iones en electrones y éstos en fotones con ayuda de un material fosforescente que finalmente mediante un fotomultiplicador proporciona la señal a medir. Estos detectores son altamente utilizados debido a que su vida útil es más larga que los electromultiplicadores, tienen una respuesta muy rápida y una sensibilidad similar.

4. OBJETIVOS

La reutilización de aguas residuales regeneradas está aumentando en todo el mundo. A día de hoy se estima que alrededor del 30% de las aguas residuales tratadas están siendo utilizada para uso agrícola. No obstante, los riesgos potenciales asociados a la presencia de productos fitosanitarios en este tipo de aguas regeneradas todavía no han sido ampliamente estudiados. Por lo tanto el objetivo de este Trabajo de Fin de Grado consistió en validar un método QuEChERS modificado, para el análisis de 20 plaguicidas en muestras de suelo con el fin de evaluar la propagación y acumulación de dichos compuestos en un suelo regado con agua regenerada fortificada a concentraciones similares a aquellas esperadas en sistemas de riego agrícola (1 µg/L).

5. EXPERIMENTAL

5.1. REACTIVOS Y MATERIALES

5.1.1. Reactivos químicos

Los patrones estándar analíticos de los 20 plaguicidas tenían una pureza mayor del 96%, fueron suministrados por el Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemania) y por Riedel-de Haën (Selze, Alemania) y almacenados a -30°C. Las disoluciones patrón de plaguicidas individuales se prepararon en acetonitrilo y acetato de etilo y se almacenaron en viales de vidrio ámbar con tapón de rosca en oscuridad a -20°C. Las disoluciones individuales de estándares para la optimización y 2 soluciones mezcla de estándares utilizadas para la calibración fueron preparadas a partir de los estándares patrón.

Respecto a los disolventes utilizados en el análisis cromatográfico, fueron acetonitrilo de grado HPLC obtenido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), agua Milli-Q producida por el sistema de agua ultrapura de Millipore (Milford, MA, Estados Unidos), y ácido fórmico (pureza 98%) obtenido de la empresa Fluka (Buchs, Suiza).

Los reactivos utilizados para el procedimiento de extracción basado en el método QuEChERS, fueron: citrato trisódico dihidratado de Fluka (Steinheim, Alemania), cloruro sódico de J.T. Baker (Deventer, Países Bajos), citrato sódico dibásico sesquihidratado de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se utilizó también sulfato magnésico anhidro de Panreac (Barcelona, España) y C₁₈ de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos).

5.1.2. Materiales y equipos

Para el procedimiento de extracción QuEChERS se utilizaron los siguientes materiales: un tamiz (FILTRA, Badalona, España) con una malla porosa de 203 mm, un desecador (MEMMERT Modelo 30-1060, Schwabach, Alemania), matraces aforados de 50 mL (VidraFOC, Barcelona, España), vasos de precipitado (Schott Duran, Alemania) y micropipetas (Pipetman, Madrid, España).

Para el análisis de las muestras se empleó un cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent 1290 series (Agilent Technologies, Singapur) equipado con una bomba binaria y una columna analítica de fase reversa de C₈ de dimensiones 2,1 mm x 100 mm y 1,8 µm de tamaño de partícula (Agilent Zorbax Eclipse Plus).



Figura 7. Sistema de HPLC Agilent 1290 series

El espectrómetro de masas utilizado fue un sistema MS/MS QqQ 6490 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) que opera en modo de ionización positiva. Se utilizó nitrógeno tanto como gas nebulizador como gas de colisión.

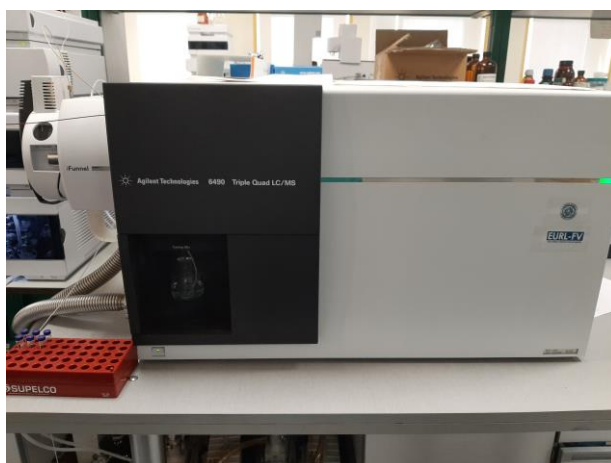


Figura 8. Sistema MS/MS QqQ 6490 series

En cuanto al desarrollo del método y adquisición de los datos se utilizó un software de análisis cuantitativo y cualitativo denominado Mass Hunter Data Acquisition (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, v.B.06 y v.B.05).

5.2. TOMA DE MUESTRA

Las muestras de suelo se tomaron de un invernadero de la Universidad de Almería en el que se realizó un ensayo de investigación con un cultivo de plantas de col lombarda regadas durante 3 meses con un agua de riego regenerada procedente de una planta desaladora. El agua fue fortificada con 20 plaguicidas a un nivel de concentración de 1 µg/L. En la Tabla 1 se muestran algunas de las características de los plaguicidas seleccionados para el ensayo.

Tabla 1. Características de plaguicidas estudiados

Nombre	log K _{ow} (pH 7, 20°C)	Tipo	Familia
Tiametoxano	-0,13	Insecticida	Neonicotinoide
Imidacloprid	0,57	Insecticida	Neonicotinoide
Dimetoato	0,75	Insecticida	Organofosforado
Acetamiprid	0,80	Insecticida	Neonicotinoide
Propamocarb	0,84	Fungicida	Carbamato
Tiacloprid	1,26	Insecticida	Neonicotinoide
Malatión	2,75	Insecticida	Organofosforado
Pimetrozina	-0,19	Insecticida	Piridinazometrina
Tiabendazol	2,39	Fungicida	Benzimidazol
Azoxistrobin	2,50	Fungicida	Acido β-metoxiacrilico
Imazalil	2,56	Fungicida	Imidazol
Miclobutanilo	2,89	Fungicida	Triazol
Tebuconazol	3,70	Fungicida	Triazol
Penconazol	3,72	Fungicida	Triazol
Trifloxistrobin	4,50	Fungicida	Estrobilurina
Pencicuron	4,68	Fungicida	Fenilurea
Buprofezina	4,93	Insecticida	No clasificado
Piriproxifeno	5,37	Insecticida	Piridina
Pendimetalina	5,40	Herbicida	Dinitroanilina
Piridato	6,37	Insecticida	Piridazona

Se recogieron muestras de suelo en tres puntos diferentes del invernadero donde se llevó a cabo el cultivo (P₁, P₂ y P₃), y se llevaron al laboratorio para su análisis. Además, para llevar a cabo la validación del método de extracción se recogió una muestra de suelo del invernadero fuera de la zona del cultivo (P₀).

Estas muestras se tamizaron utilizando un tamiz FILTRA con 2 mm de luz para homogeneizar el tamaño de partícula y se llevaron a desecar durante 24 horas a 300°C para su secado.

Tras este tiempo se prepararon tres réplicas de cada muestra (P₁, P₂ y P₃), pesando 10 gramos cada una para el procedimiento de extracción.

5.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

5.3.1. Extracción de suelos fortificados

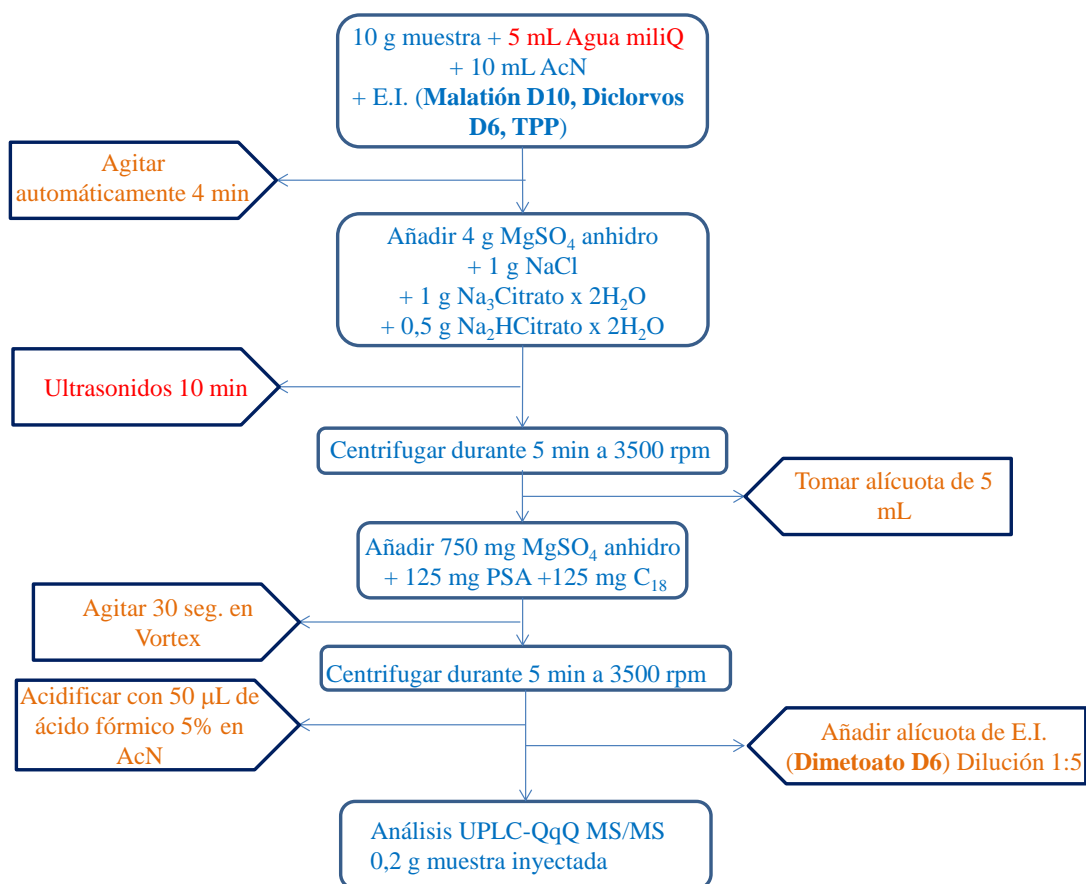
Para realizar la validación del método de extracción, tres muestras de suelo P₀ de 50 gramos cada una fueron fortificadas con distinta concentración de plaguicidas (1, 50 y 100 µg/Kg); para ello, a cada muestra se le añadió un volumen de disolución preparada en metanol que contenía una concentración de 1, 50 y 100 µg/Kg de los plaguicidas estudiados.

Tras la adición de la disolución a la muestra en vasos de precipitado, se realizó un proceso de envejecimiento de los fortificados durante 1 semana, antes de aplicar el método de extracción. Finalmente, como blanco de matriz se utilizó una cuarta alícuota de la muestra de suelo P₀ sin fortificar.

5.3.2. Extracción de muestras reales

El procedimiento de extracción fue un método modificado de extracción en fase dispersiva (d-SPE) QuEChERS usando tampón citrato, como se describe en la figura 9:

Figura 9. Procedimiento de extracción y limpieza



Se pesaron 10 gramos de muestra de suelo, previamente homogeneizada, en un tubo Falcon de 40 mL. Tras ello se añadieron 5 mL de agua y se dejó reposar la disolución 30 minutos antes de añadir 10 mL de acetonitrilo y 10 µL de un estándar interno compuesto por malatión D10, diclorvos D6 y TPP.

Posteriormente la disolución se llevó a un equipo de agitación automática llamado Agitex, durante 4 minutos antes de proseguir.

Tras agitar 4 minutos la disolución se adicionaron las sales de extracción, las cuales son 750 mg de sulfato de magnesio anhidro para secar la disolución, 1 gramo de cloruro sódico cuya función es aumentar la fuerza iónica de la disolución, 1 gramo de citrato trisódico dihidratado y 0.5 gramos de citrato disódico sesquihidratado. Estas 2 últimas sales se adicionaron para crear el tampón citrato correspondiente. Tras añadir las sales, se llevó a agitar 4 min en el Agitex y, posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, se extrajo el máximo volumen de sobrenadante para la siguiente etapa.

Lo siguiente a realizar fue la etapa de limpieza, para la cual se añadieron a la disolución 750 mg de sulfato de magnesio anhidro, 125 mg de PSA para alcalinizar el medio y retener compuestos de matriz que puedan interferir en las señales de los analitos, y 125 mg de C₁₈, para eliminar residuos orgánicos como lípidos y esteroides. Tras añadir las sales se agitó la disolución con Agitex durante 30 segundos y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos.

Por último, se extrajo el sobrenadante y se traspasaron 0,5 mL a un vial de inyección para su análisis. Se añadieron 40 µL de ácido fórmico al 5 % de acetonitrilo (10 µL/mL de sobrenadante), y se añadió una alícuota de estándar interno de dimetoato d6, con una relación de dilución 1:5 respecto a la disolución.

0,5 mL de la disolución preparada se traspasaron a un vial de inyección para su análisis en el cromatógrafo de líquidos.

5.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE MUESTRA

El análisis de los plaguicidas presentes en las muestra de suelo estudiadas se realizó mediante el uso de un cromatógrafo de líquidos Agilent 6490 series, con una columna C18 de dimensiones 2.1 x 100 mm (1.8 µm), acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

La fase móvil del análisis estaba compuesta por una mezcla de otras fases móviles. La fase móvil A estaba compuesta por metanol con un 2% de agua, 5 mM de formato de amonio y 0.1% de ácido fórmico, mientras que la fase móvil B estaba compuesta por agua Mili-Q con un 0.1 % de ácido fórmico. La elución de la cromatografía fue isocrática durante los 2 primeros minutos, con un 20% de A, y aumentando progresivamente hasta el 100% en 13 minutos, y se dejó 2 minutos más, siendo un tiempo de análisis total de 17 minutos, con una velocidad de flujo constante de 0.3 mL/min.

Las condiciones de operación del espectrómetro de masas aparecen en la Tabla 2:

Tabla 2. Condiciones de operación

Modo de ionización	Full-Scan ESI (+/-)
Gas nebulizador	45 psi
T ^a del gas	120°C
Flujo del gas	13 L/min
Voltaje	3000 V
Volumen de inyección	10 µL

5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN

El método de cromatografía de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS/MS) se validó estudiando los parámetros de linealidad, efecto matriz, precisión (o repetibilidad), recuperaciones medias (veracidad) y los límites de cuantificación (LOQ), que se explican a continuación. A tal fin se siguieron los criterios establecidos en la guía SANTE/11813/2017⁴⁷.

- Linealidad: Capacidad de producir resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra (directamente o por medio de una transformación matemática). El estudio de este parámetro se realizó con el análisis de disoluciones patrón con concentraciones de plaguicidas de 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 µg/Kg, exigiendo un ajuste por mínimos cuadrados igual o superior a 0.99.

- Efecto matriz: Resultado de la modificación de la señal de analito por interferencia de los componentes de la matriz, dependiente o independientemente de la concentración de analito en la muestra. Para evaluar este parámetro se realizaron una curva de calibración en disolvente y otra en matriz, ambas con 7 concentraciones de plaguicidas (1, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 µg/Kg).

- Precisión: Grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitivamente el mismo método analítico a alícuotas distintas de la misma muestra. Este parámetro se expresa en términos de desviación estándar (SD), o desviación estándar relativa (RSD).

- Veracidad: La veracidad es el grado de concordancia entre el valor medio y el valor verdadero. La guía SANTE/11813/2017 define la veracidad como la proximidad entre un valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia o valor verdadero. La veracidad se evalúa midiendo las recuperaciones. Para determinar la veracidad del experimento se realizaron estudios de recuperación a tres niveles de concentración (1, 50 y 100 µg/Kg), y con cinco réplicas de cada nivel.

-Límites de cuantificación: Se define como la concentración más baja de analito que ha sido validada con una exactitud aceptable aplicando el método analítico completo.

⁴⁷ Guía SANTE/11813/2017; Control analítico de calidad y procedimientos de validación de métodos para análisis de residuos de plaguicidas en comida y alimentos, 2017.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Con el propósito de comprobar la aplicabilidad del método de extracción utilizado, de manera que proporcione resultados lo suficientemente precisos y fiables, se realizaron cálculos para la obtención de una serie de parámetros, los cuáles fueron linealidad, veracidad, precisión, el efecto matriz y el límite de cuantificación y detección.

- Linealidad: Este parámetro se evaluó como se explica en el punto 5.5 de validación del método. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. Como se puede observar en dicha tabla, los 20 plaguicidas estudiados cumplen con la regla establecida por la Guía SANTE/11813/2017, con un ajuste superior al 0,99, exceptuando el pesticida Trifloxystrobin en matriz, cuyo ajuste fue 0,96.

Tabla 3. Linealidad en base de valores de R²

Plaguicidas	Linealidad	
	R ² Disolvente	R ² Matriz
Acetamiprid	0,9995	0,9995
Azoxistrobin	0,9982	0,9991
Buprofezin	0,9999	0,9990
Dimetoato	0,9996	0,9998
Imazalil	0,9955	0,9988
Imidacloprid	0,9996	0,9995
Malatión	0,9944	0,9997
Miclobutanil	0,9992	0,9993
Penconazol	0,9998	0,9997
Pencicuron	0,9996	0,9990
Pendimetalin	0,9998	0,9988
Propamocarb	0,9993	0,9998
Pimetrozina	0,9990	0,9988
Piridato	0,9991	0,9882
Piriproxifeno	0,9935	0,9978
Tebuconazol	0,9997	0,9973
Tiabendazol	0,9953	0,9996
Tiacloprid	0,9939	0,9990
Tiametoxano	0,9998	0,9997
Trifloxistrobin	0,9967	0,9546

- Veracidad: La veracidad estudiada se expresa en términos de porcentaje de recuperación, evaluando concentraciones de 1, 50 y 100 µg/Kg. Los valores expresados en la tabla 4 corresponden al promedio resultante de las 5 réplicas realizadas por cada concentración dicha.

Las recuperaciones obtenidas para 17 de los 20 plaguicidas estudiados estuvieron en el rango de 70-120%, lo que confiere a este método una excelente exactitud según lo establecido por la Guía SANTE/11813/2017. Los plaguicidas pimetrozina (49%), propamocarb (28%) y tiabendazol (69%) no tuvieron una buena recuperación debido al enorme efecto matriz que sufren.

- Precisión: La precisión intra-día se calculó mediante el uso de la Desviación Estándar Relativa (RSD) correspondiente al promedio resultante de los niveles de concentración de plaguicidas de 1, 50 y 100 µg/Kg. Los valores obtenidos, y que se pueden observar en la tabla 4, no superaron en ningún caso el 20%, encontrándose el máximo en un 15%, siendo por tanto resultados aceptables.

Tabla 4. Recuperaciones y precisión de plaguicidas en ppb

Plaguicidas	Recuperaciones y Precisión Intradía (RSD) en %					
	1 µg/Kg		50 µg/Kg		100 µg/Kg	
	Recup	RSD	Recup	RSD	Recup	RSD
Acetamiprid	113	3	101	7	112	5
Azoxistrobin	116	7	98	8	116	8
Buprofezin	114	8	102	3	106	5
Dimetoato	100	9	96	6	107	5
Imazalil	89	7	89	5	94	4
Imidacloprid	112	2	102	6	113	3
Malatión	117	9	91	6	99	15
Miclobutanil	103	9	108	9	124	4
Penconazol	112	3	96	2	109	4
Pencicuron	117	5	100	6	114	4
Pendimetalin	114	5	103	7	130	7
Propamocarb	32	11	23	12	28	1
Pimetrozina	77	11	22	16	21	13
Piridato	141	6	109	4	160	8
Piriproxifeno	116	9	102	3	134	11
Tebuconazol	109	6	102	3	111	7
Tiabendazol	115	7	45	10	47	4
Tiacloprid	106	5	102	6	115	5
Tiametoxano	117	4	100	6	109	5
Trifloxistrobin	104	4	102	5	118	3

- Efecto matriz: Para evaluar el efecto matriz se compararon las pendientes de las rectas de calibrado en disolvente y en matriz, mediante la siguiente ecuación:

$$EM(\%) = \frac{Pendiente_{Disolvente} - Pendiente_{Matriz}}{Pendiente_{Disolvente}} \times 100$$

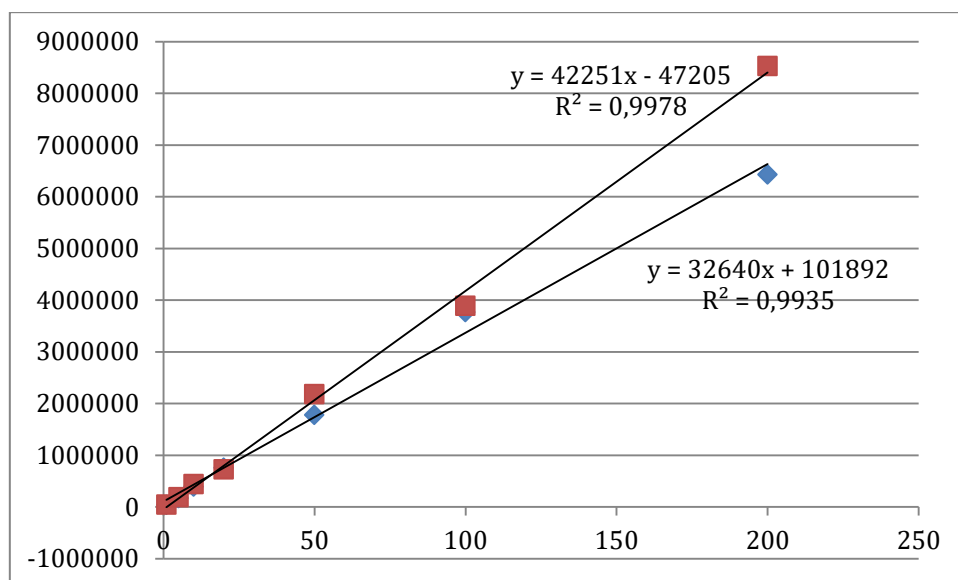
El efecto matriz en los 20 plaguicidas se muestra en la Tabla 5. En todos los casos se observó supresión de la señal, excepto para los plaguicidas pimetrozina y trifloxistrobin que mostraron aumento de la señal.

Los valores de EM (%) obtenidos ponen de manifiesto que 18 de los plaguicidas estudiados mostraron un EM moderado (20-35%), y dos compuestos, miclobutanil y trifloxistrobin, no presentaron EM (<10%) Un ejemplo visual del efecto matriz ocasionado por el pesticida piriproxifeno se puede observar en la figura 9.

Tabla 5. Efecto matriz para distintos plaguicidas

Plaguicidas	Efecto matriz (%)
Acetamiprid	-26
Azoxistrobin	-20
Buprofezin	-34
Dimetoato	-23
Imazalil	-30
Imidacloprid	-23
Malatión	-22
Miclobutanil	-10
Penconazol	-22
Pencicuron	-24
Pendimetalin	-29
Propamocarb	-27
Pimetrozina	20
Piridato	-35
Piriproxifeno	-29
Tebuconazol	-21
Tiabendazol	-25
Tiaclorprid	-26
Tiametoxano	-24
Trifloxistrobin	1

Figura 10. Representación del efecto matriz en Piriproxifeno

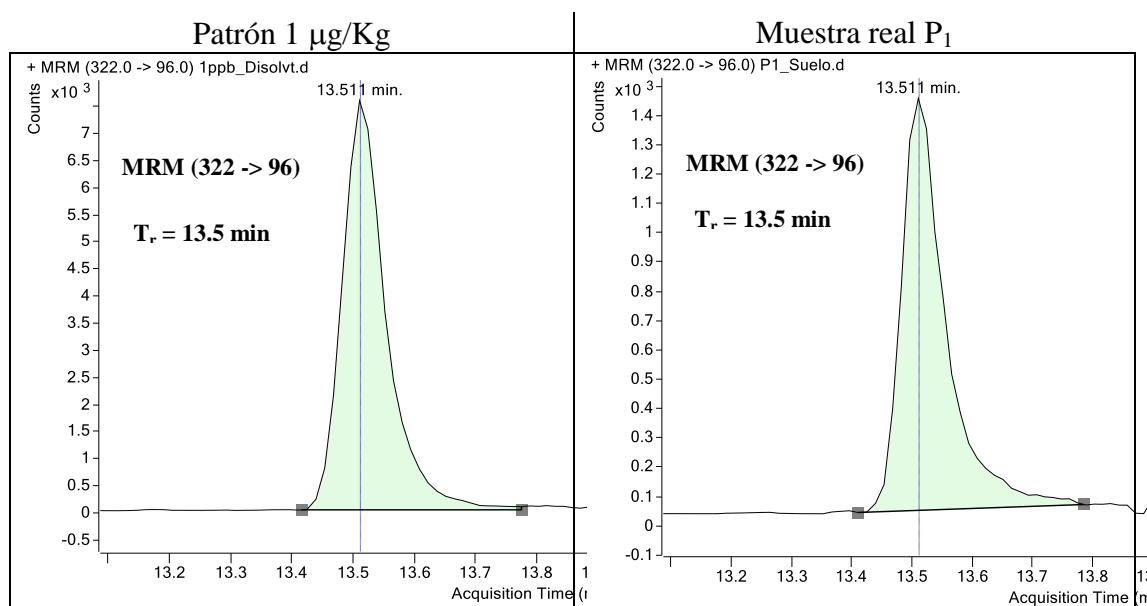


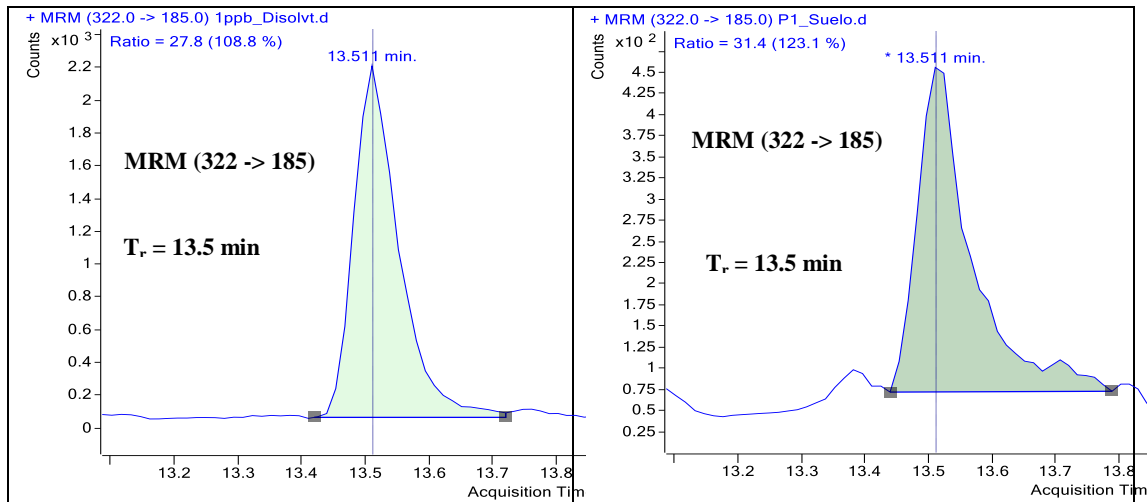
- LOQ: Debido a que la concentración mínima de patrones utilizados para la validación del método fue de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, el límite de cuantificación establecido para este experimento es de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para todos los plaguicidas, menos para el fungicida tebuconazol, el cual fue de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de suelo.

6.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Finalmente, el método validado se aplicó al análisis de plaguicidas en muestras de suelo. Se procedió a analizar tres muestras de suelo de un mismo invernadero para evaluar la propagación y acumulación de los plaguicidas objeto de estudio. Los resultados que se obtuvieron se puede observar a continuación en la Tabla 6. Para la identificación y confirmación de cada uno de los plaguicidas detectados en las muestras analizadas, se tuvieron en cuenta los tres criterios establecidos en la guía SANTE/11813/2017⁴⁷: tiempo de retención, 2 transiciones y el correspondiente ratio (ver Tabla A1.7 del anexo). A continuación se muestra un ejemplo de identificación y determinación del plaguicida piriproxifeno en una muestra real de suelo, con ayuda del patrón de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ utilizado.

Figura 11. Ejemplo de identificación de piriproxifeno





En la Tabla 6 puede observarse que de los 20 plaguicidas estudiados, solamente 8 fueron determinados en las muestras de suelo analizadas, a niveles por encima de su LOQ, pudiendo ser debido a distintas propiedades como la solubilidad, como se explica en la figura 15. Se Los pesticidas determinados se encontraron a niveles de concentración entre 1 y 9 µg/kg, observándose una gran variabilidad en los valores encontrados entre las tres muestras de suelo analizadas.

Tabla 6. Concentración de plaguicidas en las muestras de suelo analizadas (µg/Kg peso seco, ppb)

Pesticidas	LOQ (µg/Kg)	Muestras Suelo (µg/Kg)			
		P1	P2	P3	Media
Acetamiprid	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Azoxistrobina	1	6,3	2,8	3,8	4,3
Buprofezin	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Dimetoato	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Imazalil	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Imidacloprid	1	1,7	1,7	1,1	1,5
Malatión	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Miclobutanil	1	1,4	1,5	1,7	1,5
Penconazol	1	3,5	1,0	2,0	2,2
Pencicuron	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Pendimetalin	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Propamocarb	1	1,1	1,0	1,0	1,0
Pimetrozina	1	7,2	1,0	1,8	3,3
Piridato	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Piriproxifeno	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Tebuconazol	5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Tiabendazol	1	7,8	1,6	3,0	4,1
Tiacloprid	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Tiametoxano	1	9,0	1,0	1,0	3,7
Trifloxistrobin	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	

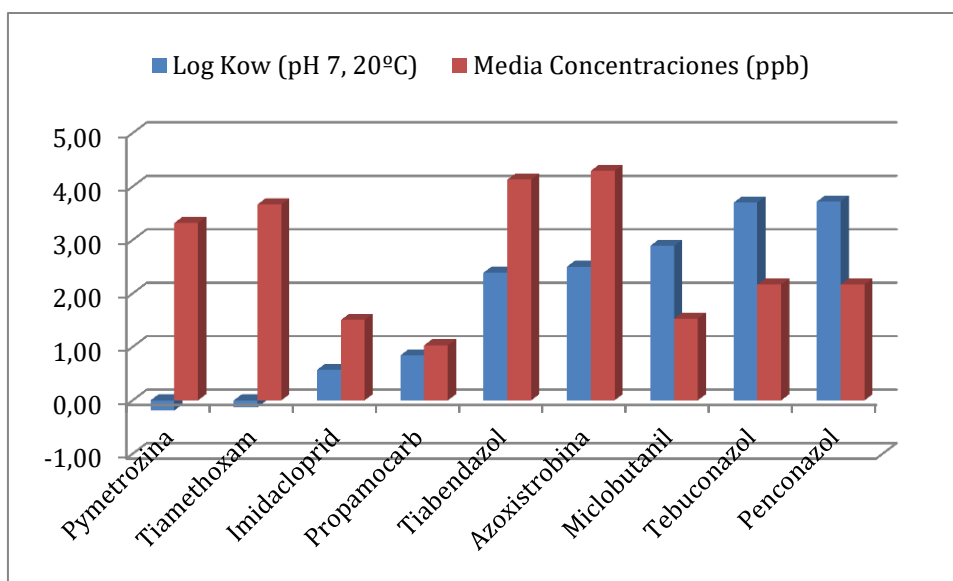


Figura 12. Media de concentraciones de plaguicidas ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de menor a mayor $\log K_{ow}$

En la figura 15 se puede observar que a medida que aumenta el valor de $\log K_{ow}$, los niveles de concentración de los plaguicidas determinados en las muestras de suelo analizadas disminuyen, observándose de manera general concentraciones superiores para aquellos plaguicidas que presentaban valores de $\log K_{ow}$ inferiores a 2.

7. CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado cumple los requisitos de linealidad y veracidad, además de ser capaz de reducir o eliminar el efecto matriz producido por los interferentes de la matriz en algunas señales de analito.

De los 20 plaguicidas estudiados, solamente 8 fueron determinados en las muestras de suelo analizadas, a niveles por encima de su límite de cuantificación en cada caso. Como cabía esperar y en base a los resultados obtenidos es posible concluir que efectivamente la acumulación de plaguicidas en el suelo depende de sus propiedades físico-químicas, entre otros factores, como también se ha reportado en otros trabajos previos (tipo y propiedades del suelo, tipo de planta, etc.).

Plaguicidas con $\log K_{ow}$ superiores a 4, no fueron identificados en ninguna de las muestras de suelo analizadas. Esto puede ser debido a que sustancias con valores superiores a 4 presentan baja o escasa solubilidad en agua y, por ello, es posible que no estuvieran bien disueltas en el agua de riego fortificada y empleada para el estudio. Así, los plaguicidas que presentaban valores de $\log K_{ow}$ inferior a 4 fueron las sustancias detectadas a niveles por encima de su LOQ, mientras que aquellos fitosanitarios que tenían valores superiores a 4 no fueron detectados a niveles cuantificables en ninguna de las muestras analizadas.

8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization.
- API: Atmospheric Pressure Ionization.
- d-SPE: dispersive Solid Phase Extraction.
- DDT: Dicloro Difenil Tricloroetano.
- ESI: Electro-Spray Ionization.
- GC: Gas Chromatography.
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography.
- IFAPA: Instituto de Investigación de Formación Agraria y Pesquera.
- LC: Liquid Chromatography.
- LLE: Liquid-Liquid Extraction.
- LOQ: Limit of quantification,
- LOD: Limit of detection.
- MS: Mass Spectrometry.
- MRM: Multiple Reaction Monitoring.
- PIS: Precursor Ion Scan.
- QQQ: Triple Quadrupole.
- SIM: Selective Ion Monitoring.
- TOF: Time Of Flying.
- PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- UE: Unión Europea.
- QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe.

ANEXOS

ANEXO 1: Parámetros optimizados del método de análisis**Tabla A1.7**

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ion precursor	Primera transición		Segunda transición		Polaridad
			Ion	CE	Ion	CE	
Acetamiprid	4.4	223.00	126.00	20	56.00	15	Positiva
Azoxistrobin	9.6	404.00	372.00	10	344.00	20	Positiva
Buprofezin	10.1	306.00	201.00	10	116.00	15	Positiva
Dimetoato	4.2	230.00	199.00	5	171.00	10	Positiva
Imazalil	6.4	297.00	255.00	15	159.00	20	Positiva
Imidacloprid	3.8	256.00	209.00	15	175.00	15	Positiva
Malatión	10.4	331.00	127.00	10	99.00	20	Positiva
Miclobutanil	9.6	289.20	125.10	20	70.20	15	Positiva
Penconazol	10.2	284.00	159.00	20	70.00	15	Positiva
Pencicuron	11.7	329.10	125.10	24	89.10	60	Positiva
Pendimetalina	13.0	282.10	212.10	4	194.10	16	Positiva
Propamocarb	1.1	189.20	144.10	10	102.10	15	Positiva
Pimetrozina	0.9	218.11	105.00	20	51.00	60	Positiva
Piridato	14.6	379.10	351.10	5	206.80	10	Positiva
Piriproxifeno	12.6	322.00	185.00	20	96.00	10	Positiva
Tebuconazol	9.9	308.00	125.00	20	70.00	20	Positiva
Tiabendazol	1.3	202.00	175.00	30	131.00	40	Positiva
Tiacloprid	5.5	253.00	186.00	10	126.00	20	Positiva
Tiametoxano	2.4	292.00	211.00	10	181.00	20	Positiva
Trifloxistrobin	12.2	409.20	206.20	10	186.20	20	Positiva