



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Hidrogeología y Química Analítica

Máster Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

“Evaluación de la presencia de plaguicidas en suelos agrícolas almerienses”



Autor: Pedro José Amorós Cortés

Tutores: Roberto Romero González

Patricia Plaza Bolaños

Febrero 2012

TRABAJO FIN DE MÁSTER

El presente trabajo ha sido presentado por **Pedro José Amorós Cortés** correspondiente al Máster: Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental.

Fdo. Pedro José Amorós Cortés

Tutores:

Fdo. Roberto Romero González

Fdo. Patricia Plaza Bolaños

Índice.

I. PRESENTACIÓN	3
II. MEMORIA CIENTÍFICA	8
1. Objeto y campo de aplicación	8
2. Introducción	9
2.1. El suelo y su composición	9
2.2. Contaminación medioambiental por plaguicidas	11
2.3. Persistencia y descomposición de plaguicidas en suelos	14
2.4. La contaminación de los suelos en diferentes tipos de invernaderos	18
2.5. Legislación vigente.....	19
2.6. Análisis de residuos de plaguicidas en suelos	21
3. Experimental	23
3.1. Reactivos y materiales	23
3.2. Instrumentación analítica.....	24
3.2.1. Determinación de plaguicidas apolares	24
3.2.2. Determinación de plaguicidas polares	25
3.3. Extracción mediante PLE	25
3.4. Análisis mediante GC-QqQ-MS/MS.....	26
3.5. Análisis mediante UHPLC-QqQ-MS/MS	27
3.6. Muestreo	27
4. Resultados y discusión	29
4.1. Evaluación de la presencia de plaguicidas persistentes.....	32
4.2. Evaluación de la presencia de plaguicidas no persistentes.....	38
5. Conclusiones y propuestas de trabajo futuras	49
6. Referencias	51

I. PRESENTACIÓN

El Máster “**Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental**”, curso 2011-2012, consta de 60 créditos ECTS y está estructurado en 5 módulos. Los tres primeros son de contenido teórico, el cuarto de carácter práctico y el quinto corresponde al Trabajo Fin de Máster. El máster lo he cursado en dos cursos académicos. Durante el curso 2008-2009 realicé los módulos 3 y 4 y en el curso académico 2011-2012 he realizado los módulos 1 y 2, así como el Trabajo Fin de Máster.

Los módulos en los que se compone el Máster son:

Módulo 1. Plaguicidas (12 ECTS)

Módulo 2. Contaminantes (9 ECTS)

Módulo 3. Gestión de laboratorios (9 ECTS)

Módulo 4. Experimentación en técnicas cromatográficas (15 ECTS)

Módulo 5. Trabajo Fin de Máster (15 ECTS)

Módulo I – Plaguicidas (2011-2012)

Se desarrollan las siguientes asignaturas:

1. Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos).
2. Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos).
3. Registro de plaguicidas (3 créditos).
4. Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos).

En la primera asignatura, se han estudiado las diferentes técnicas de aplicación de los plaguicidas, con las tendencias actuales para llevar a cabo una aplicación más efectiva. También se ha indicado la repercusión a nivel mundial del uso de plaguicidas y en la segunda parte de la asignatura se han visto las diferentes familias de estos compuestos.

En la segunda asignatura, se han adquirido las bases para una política alimentaria

efectiva, determinando cuales son los riesgos tanto potenciales como reales para la salud de los consumidores derivados de los alimentos, tanto a nivel de la producción como de su procesado. Así, se ha estudiado toda la legislación aplicable a nivel mundial y sus trasposiciones a nivel europeo y nacional en los diferentes Reglamentos, Directivas y Reales Decretos. En la segunda parte de la asignatura se han estudiado los sistemas de control establecidos y su eficacia para asegurar la correcta aplicación y control de las distintas normativas.

Además, se han estudiado en las otras asignaturas aspectos sobre tipos, aplicaciones y formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, considerando tanto la eficacia como su impacto en el medioambiente.

Módulo II – Contaminantes (2011-2012)

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos).
2. Contaminación y remediación de suelos (3 créditos).
3. Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos).

En este módulo se definen los conceptos de trazabilidad, el plan plurianual de control oficial y la organización de controles oficiales, fijando históricamente su aparición y explicando la legislación que los define y desarrolla.

Se ha proporcionado una visión sobre los contaminantes más relevantes en el suelo y los diferentes métodos y técnicas para la prevención, así como para la remediación de suelos contaminados.

Finalmente, se han abordado aspectos de toxicología general, alimentaria y ambiental, destacando la clasificación de sustancias tóxicas, el fenómeno tóxico y las fases de la acción tóxica.

Módulo III – Gestión de laboratorios (2008-2009)

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos).
2. Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos).
3. Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos).

En este módulo, en la primera asignatura se estudian los requisitos básicos del muestreo y los distintos tipos de métodos de muestreo. También se estudia como diseñar un plan de muestreo, los errores asociados al mismo y la legislación relacionada.

Por otro lado, se evalúan los distintos procedimientos de la preparación de muestra, así como una clasificación de las técnicas de extracción.

También se han expuesto los tipos de tratamientos de datos analíticos, control de calidad y la validación de métodos analíticos cualitativos y cuantitativos.

En las otras dos asignaturas se han estudiado los sistemas de calidad, indicando las normas de calidad y gestión ambientales aplicables generales, así como las más específicas para el trabajo de laboratorio en relación a su gestión y acreditación, indicando como desarrollar el manual de calidad para cada tipo de norma. Además, se han estudiado las buenas prácticas de laboratorio.

Modulo IV – Experimentación en técnicas cromatográficas (2008-2009)

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Espectrometría de masas (3 créditos).
2. Productos de transformación de plaguicidas (2 créditos)
3. Exposición a plaguicidas (2 créditos).
4. Experimentación en cromatografía de gases (4 créditos).
5. Experimentación en cromatografía de líquidos (4 créditos).

En la asignatura de Espectrometría de Masas se ha estudiado todo lo referente a la técnica de espectrometría de masas como tipos de fuentes de ionización, analizadores, modos de operación y su aplicación para la identificación de plaguicidas y sus posibles productos de degradación en el sector agroalimentario y ambiental.

A través de los contenidos de la asignatura de “Productos de transformación de plaguicidas” se tocaron temas sobre los procesos de transformación de plaguicidas, las características físico-químicas de los mismos, su determinación y extracción, la identificación de los compuestos de transformación de los plaguicidas mediante espectrometría de masas y otras técnicas, y el desarrollo de estrategias de identificación en estudios de degradación. Además, se estudiaron los fundamentos y aplicaciones de la cromatografía de líquidos acoplada a un equipo de resonancia magnética nuclear (RMN). Como práctica, se visitó el Servicio Central de Investigación donde se estudió el funcionamiento de un equipo de RMN.

En la asignatura de “Exposición a plaguicidas” se han estudiado metodologías analíticas para la evaluación de riesgos de exposición humana a plaguicidas como consecuencia de su aplicación en cultivos intensivos, así como las medidas de seguridad que se tienen para evitar la exposición a los plaguicidas durante su aplicación, como son los equipos de protección individual (EPIs), que usen los aplicadores y los equipos de protección colectivos.

Finalmente, en las dos últimas asignaturas del Máster, “Experimentación en cromatografía de gases” y “Experimentación en cromatografía de líquidos”, que han sido fundamentalmente de carácter experimental, se han realizado trabajos de laboratorio donde se han evaluado las técnicas cromatográficas, tanto de líquidos como de gases acopladas a los diferentes tipos de detectores tanto convencionales (p. ej. fluorescencia) y avanzados (p. ej. espectrometría de masas). Así, se ha estudiado como influyen en la determinación de plaguicidas los diferentes tipos de cromatografía existentes, como la elección de un tipo de detección u otros, condiciones de separación cromatográfica (tipo de fase móvil, programación de temperaturas, etc.).

Módulo V – Trabajo fin de máster (15 Créditos) (2011-2012).

El Trabajo Fin de Máster titulado “*Evaluación de la presencia de plaguicidas en suelos agrícolas almerienses*” se encuadra en la línea de investigación “Métodos analíticos para residuos y contaminantes orgánicos en muestras alimentarias, ambientales y biológicas mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas”.

En el desarrollo de este trabajo de investigación se han adquirido habilidades y conocimientos para:

- 1- El tratamiento y análisis de datos experimentales.
- 2- Búsqueda de información relacionada con el trabajo científico desarrollado.

II.- MEMORIA CIENTIFICA.

1. Objeto y campo de aplicación.

Los objetivos que se pretenden alcanzar mediante la realización del presente Trabajo Fin de Máster son:

- ⇒ Realizar un estudio de la presencia de plaguicidas en el suelo de distintos invernaderos de la provincia de Almería, donde se están aplicando prácticas relacionadas con la lucha integrada.
- ⇒ Observar la evolución de los plaguicidas en el suelo durante el tiempo al realizar distintos muestreos.
- ⇒ Monitorizar la evolución de los plaguicidas persistentes y prohibidos por la legislación, así como los permitidos, comparando los resultados obtenidos con los límites máximos de residuos fijados por la legislación española.

2. Introducción.

2.1. El suelo y su composición.

La palabra **suelo** se deriva del latín *solum*, que significa suelo, tierra o parcela¹. El suelo es esencial para la vida, como lo es el aire y el agua, y cuando es utilizado de manera prudente puede ser considerado como un recurso renovable. Es un elemento de enlace entre los factores bióticos y abióticos y se le considera un hábitat para el desarrollo de las plantas.

Los suelos constan de cuatro grandes componentes: materia mineral, materia orgánica, agua y aire, siendo la composición volumétrica aproximada de 45%, 5%, 25% y 25%, respectivamente².

a) Composición química.

En relación a la composición química de los suelos, en la Tabla 1 se muestra la composición en función del tipo de suelo/roca, pudiendo señalar que los principales componentes, de manera general, son SiO_2 y Al_2O_3 ³.

Tabla 1. Composición química de los suelos.

Constituyente	Rocas ígneas promedio	Suelo volcánico reciente	Suelo medianamente meteorizado	Suelo altamente meteorizado	Roca volcánica
SiO_2	59.1	49.2	31.4	3.3	62.0
Al_2O_3	15.3	20.0	25.3	18.5	19.5
Fe_2O_3	7.3	17.5	1.3	63.0	4.5
TiO_2	1.0	1.7	1.1	0.8	0.8
MnO	0.1	ND ¹	ND	0.4	0.6
CaO	5.1	1.0	0.1	0.1	5.0
MgO	3.5	1.0	0.1	0.3	2.1
K_2O	3.1	0.6	0.5	0.1	1.8
Na_2O	3.8	1.3	0.1	0.5	4.3
P_2O_5	0.3	ND	ND	ND	0.2
SO_3	0.1	ND	ND	ND	0.0
Perdida ignición	1.2	ND ¹	10.32	12.7	ND
Total	99.9	100.3	70.22	99.7	100.3

¹ ND: No detectado

b) Composición biológica.

Los organismos del suelo juegan un papel muy importante en la transformación de la materia orgánica y su presencia es indispensable para la fertilidad de los suelos.

De forma general, el suelo presenta macrofauna, mesofauna y microorganismos. La macrofauna está compuesta por lombrices, milpiés, ciempiés, hormigas, chanchitos de humedad, etc., mientras que la mesofauna se encuentra representada por colémbolos, opiliones, nematodos, etc.⁴. Por otro lado, entre los microorganismos se pueden encontrar los protozoos, bacterias y algunos hongos y algas microscópicos. Existen millones y participan en la descomposición de la materia orgánica, mostrándose a modo de ejemplo en la Tabla 2 el promedio de algunas poblaciones microbianas⁵.

Tabla 2. Poblaciones microbianas de un suelo cultivado fértil (número de organismos por gramo de suelo).

ORGANISMO	NÚMERO
Eubacterias:	
Por recuento microscópico directo	2.500.000.000
Por recuento de bacterias viables sobre agar común	15.000.000
Actinomicetos	700.000
Hongos	400.000
Algas	50.000
Protozoos	30.000

Cuanto mayor sea la actividad microbiana, más rápida será la degradación de los compuestos orgánicos presentes en el suelo, incluidos los plaguicidas. Paralelamente, la disminución del contenido en residuos de plaguicidas también puede ocurrir por la evaporación y la fotodescomposición⁶. La temperatura del suelo también influye en la actividad microbiana del suelo y degradación de plaguicidas.

2.2.- Contaminación medioambiental por plaguicidas.

Un **suelo contaminado** se puede considerar como un suelo degradado, debido a la acumulación de sustancias a unos niveles tales que repercuten negativamente en el comportamiento de los suelos, siendo tóxicas para los organismos del suelo. Se trata pues de una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo⁷.

La contaminación de suelos en explotaciones agrícolas tales como invernaderos se debe principalmente a plaguicidas, siendo su principal vía de inclusión en el suelo, la aplicación de los tratamientos fitosanitarios necesarios en cada momento. Si los trabajadores están bien entrenados y formados, se producirá una menor contaminación, ya que la manera de realizar la aplicación se efectuará de la manera más efectiva posible, aprovechando el producto al máximo y minimizando las pérdidas del producto, que de forma general suelen caer en el suelo⁸.

La presencia y movimiento del plaguicida se relaciona estrechamente con la forma de aplicación, siendo una de ellas la aplicación directa, la cual considera productos de tipo granular o inyectados. Otra forma de aplicación es la no intencional, la cual se origina por la dispersión del producto al momento de su aplicación. Los problemas de dispersión ocurren durante el rociado terrestre o aéreo, estando influido por la formulación del plaguicida, parámetros de aplicación tales como el diseño de la boquilla y propiedades de fluidez, condiciones meteorológicas, altura de liberación y tamaño del área tratada.

Un alto porcentaje (30 % o más) de una aplicación por rociado puede llegar a moverse 15 cm del área tratada o incluso más lejos, si las condiciones son ideales para la dispersión, como puede ser la presencia de vientos. En este tipo de aplicación resulta importante el tamaño de la gota para favorecer o no la dispersión, pues se ha encontrado que las gotas pequeñas producto del rociado, tienden a desplazarse más lejos que las gotas grandes. Para el trabajo bajo plástico, además de la aplicación aérea de las plantas y en las que se puede producir contaminación de los suelos por el problema de caída de las gotas desde las plantas al suelo, se puede llevar a cabo la aplicación mediante el

sistema de riego del invernadero y de esta manera el plaguicida va directo al suelo desde donde realiza su función^{9,10}.

También es muy importante a la hora de realizar las aplicaciones que éstas se realicen con equipos lo más adecuados posibles, de tal manera que las aplicaciones sean altamente efectivas, evitando de esta forma la deriva de los fitosanitarios hacia el suelo, por ejemplo, como puede ser reduciendo la caída por efecto de la gravedad de producto ya depositado en las hojas de las plantas.

Sin embargo, el mayor problema radica cuando se realizan aplicaciones directas sobre el suelo, como puede ser en plantaciones pequeñas, donde se aplican directamente sobre las plantas en las primeras semanas de crecimiento. Lo mismo sucede cuando se aplican herbicidas, ya que se aplican directamente en el suelo para la eliminación de estas malas hierbas que pueden competir con los futuros cultivos y reducir la producción. Adicionalmente, algunos productos fitosanitarios se aplican en la explotación directamente a través del sistema de riego, localizado al nivel del suelo.

Así, en los procedimientos de aplicación de fitosanitarios es necesario estudiar la manera más efectiva, así como técnicas y equipos para poder así realizar una aplicación lo más eficaz posible y minimizando la contaminación de los plaguicidas en el suelo debido a su aplicación, mejorando la acción de los plaguicidas, es decir, obtener un mayor rendimiento de los productos teniendo el mínimo número de pérdidas^{9,10}.

Los plaguicidas pueden encontrarse en distintas matrices medioambientales, mostrándose en la Figura 1 los diferentes procesos que sufren los plaguicidas en los distintos compartimientos medioambientales¹¹. Se pueden observar los posibles movimientos de los plaguicidas desde su aplicación, hasta su degradación, siendo transportados a diferentes medios debido a la influencia de una variedad de procesos naturales, ya sea por vaporización y posterior precipitación, por arrastre de suelos contaminados o por arrastre del plaguicida depositado en el suelo a causa de la filtración del mismo hasta aguas subterráneas, produciendo la contaminación de éstas. También se observan las posibles degradaciones de los plaguicidas, ya sea por efecto de la luz ultravioleta, degradación bacteriana en el suelo, etc.

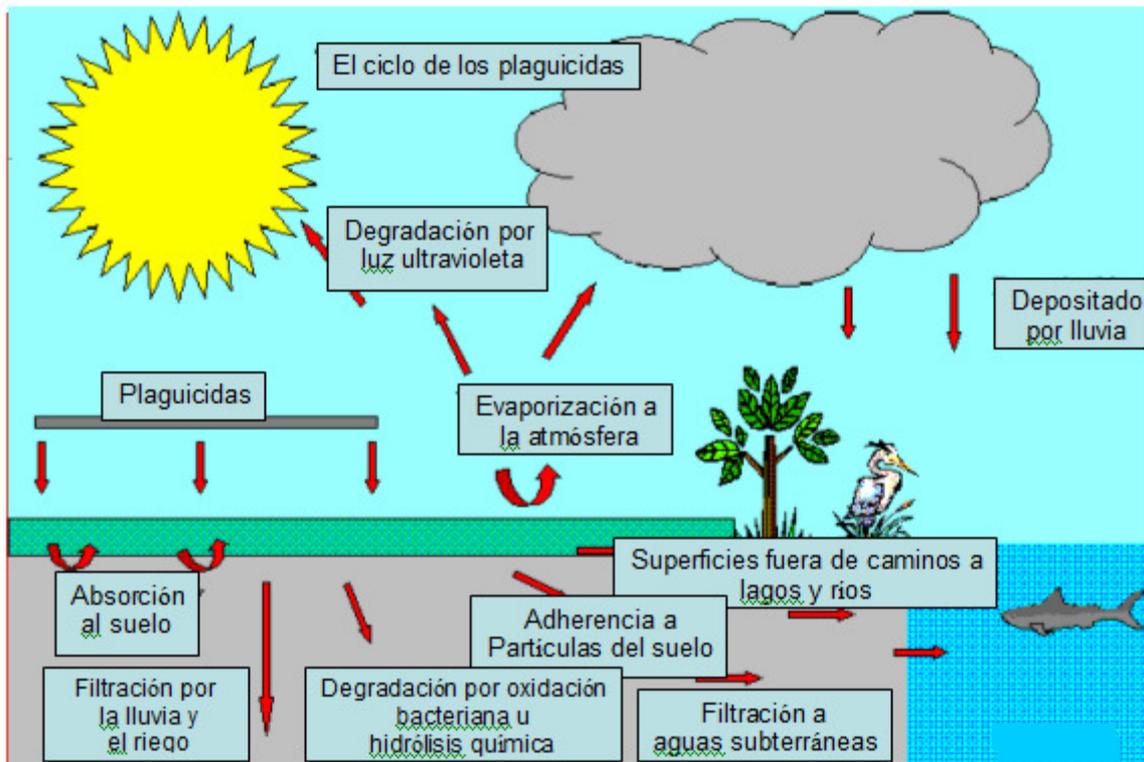


Figura 1. Transporte de los plaguicidas en el medioambiente.

Por otro lado, en la Figura 2 se observa igualmente cómo se puede favorecer la descontaminación de plaguicidas en suelo principalmente por el efecto bacteriano de los microorganismos que existen en el mismo^{2,3}.

Teniendo en cuenta todo el ciclo de movimiento/transporte/transformación que sufren los plaguicidas una vez liberados en el medio, es necesario evaluar tanto la calidad del suelo como la cantidad de materia microbiana que contiene y que ayuda a su regeneración mediante la degradación¹² de las sustancias que se depositan en el mismo hasta sustancias que pueden ser asimilables por las plantas que los habitan. Esto es importante desde el punto de vista medioambiental pero también desde el punto de vista de la producción agrícola. Así mismo, es importante destacar que si se produce una contaminación o vertido que elimine esta flora microbiana de los suelos, las principales consecuencias están relacionadas con suelos menos fértiles y con una menor capacidad de regeneración.

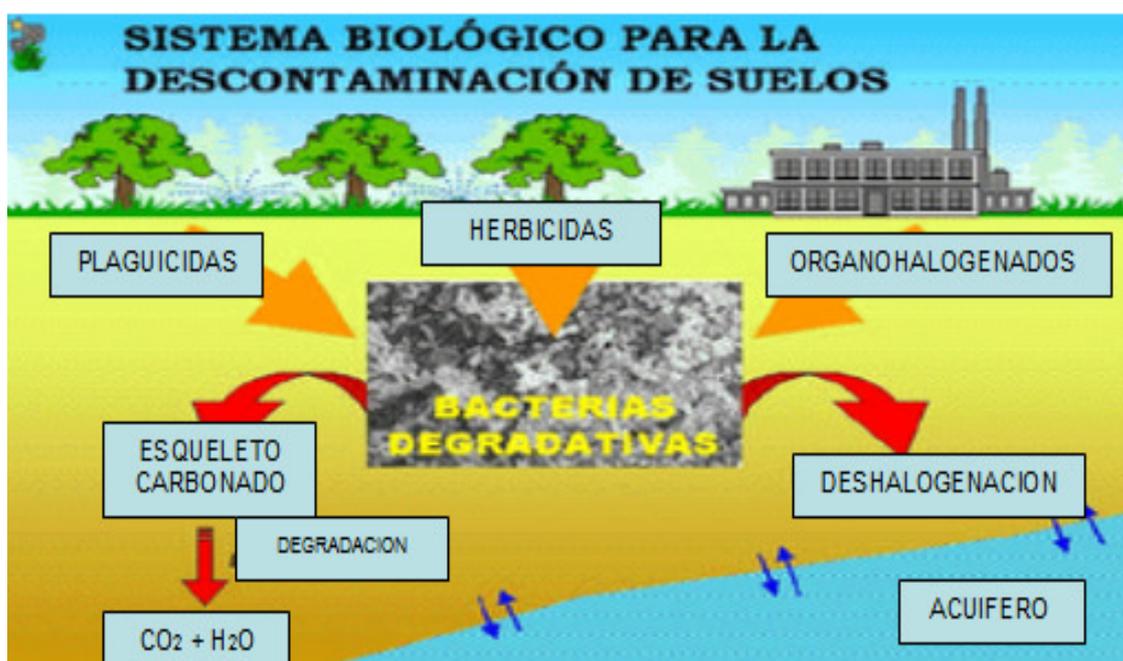


Figura 2.- Proceso de descontaminación de plaguicidas en suelos.

2.3. Persistencia y descomposición de plaguicidas en suelos.

La persistencia de los contaminantes^{13,14} que se depositan en el suelo es un factor importante que afecta a la descomposición de estas sustancias hasta compuestos menos contaminantes y asimilables por las plantas o microorganismos del suelo. El problema está en los compuestos que son muy persistentes, ya que aunque se encuentren en poca cantidad, se pueden ir acumulando en el suelo al no ser degradables y, por tanto, pueden producir una contaminación por acumulación y persistencia en el ecosistema.

Así, se puede definir la persistencia de un plaguicida como el tiempo que permanece en el suelo manteniendo su actividad biológica¹⁵. El tiempo de degradación se mide en vida media ($t_{1/2}$) y se define como el tiempo que tiene que transcurrir para que se desactive la mitad de la concentración del plaguicida. Las consecuencias de la persistencia pueden ser muy importantes, dependiendo de la toxicidad del plaguicida y de su biodisponibilidad¹⁶. Así, en la Tabla 3 se muestran algunos valores característicos para los principales tipos de plaguicidas.

Tabla 3. Persistencia de distintos tipos de plaguicidas.

Clase	Acción	Persistencia	Proceso de degradación
Organoclorados	Insecticidas	2-5 años	Deshidrohalogenación, epoxidación
Ureas	Herbicidas	4-10 meses	Desalquilación
Ácidos benzoicos	Herbicidas	3-12 meses	Deshalogenación, descarboxilación
Amidas	Herbicidas	2-10 meses	Desalquilación
Carbamatos	Herbicidas Fungicidas Insecticidas	2-8 meses	Hidrólisis de ésteres
Ácidos alifáticos	Herbicidas	3-10 semanas	Deshalogenación
Organofosforados	Insecticidas	7-8 semanas	Hidrólisis de ésteres

Estos datos demuestran que los plaguicidas más persistentes son los organoclorados (2 a 5 años), mientras que el resto van desapareciendo del suelo en un periodo inferior al año¹⁷. Por este motivo, muchos plaguicidas organoclorados han sido prohibidos y se encuentran incluidos en la lista de contaminantes orgánicos persistentes^{18, 19}. Sin embargo, estos valores deben tomarse sólo con carácter orientativo ya que la velocidad de descomposición y desaparición de estos compuestos está influenciada por las características propias de cada suelo.

Debido a todo lo indicado anteriormente, en función del plaguicida aplicado, se puede estimar el tiempo que puede permanecer en el medio sin producir su descomposición, y así saber el tiempo que van a estar depositados en el suelo.

Según lo mostrado en la Tabla 3, se puede indicar que hay plaguicidas que una vez

aplicados pueden aparecer en el medio tras varios años después de su aplicación debido a su gran estabilidad. Esto conlleva también un mayor tiempo de exposición a los mismos ya que se degradan con menor velocidad, permaneciendo mucho tiempo en el medio, lo que hace que también pueda producir la contaminación de otros medios diferentes al que se depositaron, ya sea por arrastre de aguas superficiales o aguas subterráneas²⁰.

Hay diferentes factores que influyen en que un plaguicida persista más o menos en el suelo. Estos mecanismos pueden actuar solos o en combinación sobre la estructura de los diferentes productos específicos y dependen de otras variables, como humedad, temperatura, materia orgánica, tipo de arcilla, pH, intercambio iónico del suelo, así como de las características fisicoquímicas del compuesto de que se trate. Así se pueden considerar varios factores²¹:

- **Descomposición química:** Tiene lugar por procesos de oxidación, reducción, hidroxilación, alquilación, rotura de anillos, hidrólisis e hidratación.
- **Descomposición fotoquímica:** Se produce por efecto de la luz solar. Las fuentes de luz y su intensidad regulan el grado de descomposición de un compuesto.
- **Descomposición microbiana y debida a otros organismos:** La acción de los microorganismos del suelo sobre los plaguicidas es probablemente el mecanismo de descomposición más importante. Los microorganismos del suelo (p. ej. bacterias, algas y hongos) obtienen alimento y energía para su crecimiento por descomposición de estos compuestos orgánicos, sobre todo cuando carecen de otras fuentes. Por otro lado, además de la descomposición antes mencionada, se puede observar una descomposición de estos compuestos por parte de plantas y organismos como consecuencia de los procesos metabólicos que tienen lugar en éstos.
- **Volatilización o pérdida del compuesto en forma de vapor:** Todas las sustancias orgánicas son volátiles en algún grado dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentren y de la temperatura ambiente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la volatilización no implica la degradación del compuesto sino que pasa a otro compartimento ambiental, en este caso, la atmósfera.
- **Movimiento:** El transporte de un plaguicida en el suelo, por disolución o arrastre mecánico, se hace bajo la influencia del agua, bien de las precipitaciones atmosféricas

que favorecen el movimiento de convección, bien de la imbibición que permite un desplazamiento por difusión molecular. El grado de lixiviación está influido por las características físicoquímicas del suelo, solubilidad del producto, frecuencia e intensidad de la lluvia, etc.

Un ejemplo característico de la degradación de plaguicidas en suelos agrícolas es el caso del *o,p'*-DDT, que mediante la acción de los microorganismos se puede transformar en *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDE²². Así, en la Figura 3 se muestra el mecanismo de degradación propuesto para el *o,p'*-DDT²³.

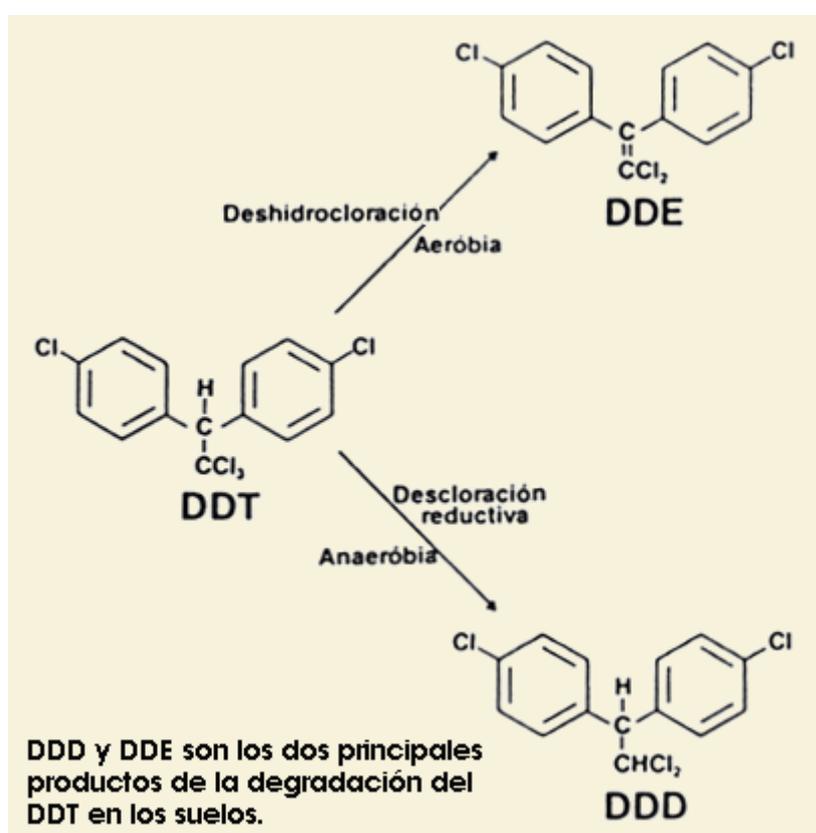


Figura 3. Mecanismo de degradación del DDT.

El uso del DDT está prohibido en EEUU desde el año 1972, estando prohibidos la producción, uso y comercialización de todos los productos de protección de plantas con DDT²⁴. Tanto el DDT como sus productos de transformación (DDE y DDD) permanecen en el suelo por mucho tiempo ya que son productos que se adhieren

firmemente al suelo, permaneciendo principalmente en las capas superficiales del suelo. Así, la contaminación de otros ecosistemas por DDT y sus derivados presentes en el suelo es principalmente por procesos de escorrentía, de partículas de suelo que contengan estos productos, siendo la parte que se filtra por el suelo al agua subterránea una parte muy pequeña.

El tiempo que el DDT permanece en el suelo, depende de la temperatura, tipo de suelo y humedad, desapareciendo más rápidamente recién aplicado en el suelo. Además, el DDT puede ser absorbido por algunas plantas, y de aquí a la cadena alimentaria (animales que consumen las plantas y a personas que consumen también las plantas o los animales que las han consumido).

2.4. La contaminación de los suelos en diferentes tipos de invernaderos.

El control biológico se define como una actividad en la que se manipulan una serie de enemigos naturales, también llamados depredadores, con el objetivo de reducir o incluso llegar a combatir por completo a parásitos que afecten a una plantación determinada.

Se pretende controlar las plagas a través de enemigos naturales, es decir, otros insectos que son depredadores de la plaga y son inofensivos a la plantación. El método de control biológico puede ser muy eficaz, debiendo de considerar algunos puntos en la utilización de enemigos naturales en la plantación, tales como los que se muestran a continuación:

1. Identificar bien el parásito que afecta al cultivo.
2. Identificar el enemigo natural.
3. Estimar la población del parásito.
4. Estimar la población del enemigo natural.
5. Seleccionar correctamente a los enemigos naturales.
6. Supervisar correctamente la eficacia de estos enemigos²⁵.

Particularizando y atendiendo al tipo de práctica agrícola empleada, es importante

destacar que en los cultivos bajo plástico en invernadero utilizados en la provincia de Almería se desarrollan principalmente dos tipos de prácticas:

- **Prácticas agrícolas bajo control biológico o lucha integrada.** Se denominan también como prácticas de producción integrada o IPMs (*Integrated Pest Management*). De las diferentes definiciones existentes, quizá la más adecuada para el ámbito agrícola sea la siguiente: "...control de plagas que combina e integra control químico y biológico. El control químico es de uso necesario y debe hacerse de tal manera que sea lo menos disruptivo posible con el control biológico. El IPM puede hacer uso de un control biológico que aparezca naturalmente en la zona así como de un control biológico efectuado por manipulación o inducción de agentes bióticos..."²⁶. Otra definición relevante es la indicada en el RD 1201/2002 por la que se define la producción integrada como "...los sistemas agrícolas de obtención de vegetales que utilizan al máximo los recursos y los mecanismos de producción naturales y aseguran a largo plazo una agricultura sostenible, introduciendo en ella métodos biológicos y químicos de control, y otras técnicas que compatibilicen las exigencias de la sociedad, la protección del medio ambiente y la productividad agrícola [...]"²⁷.

- **Prácticas tradicionales** donde se pueden aplicar cualquier tipo de plaguicida autorizado para el cultivo y plaga existente con los niveles de concentración adecuados.

Según lo indicado anteriormente, dependiendo del tipo de invernadero, la contaminación en el suelo por plaguicidas autorizados debe ser mucho menor en suelos procedentes de tratamientos con lucha integrada, debido a que se deben utilizar plaguicidas en épocas diferentes a las que se aplica la lucha biológica o mucho menos activos y persistentes para eliminar el menor número de sustancias de la lucha biológica. De esta manera, los cultivos también deben de estar cada vez más libres de plaguicidas.

2.5. Legislación vigente.

A nivel nacional, existe legislación relacionada tanto con los controles de residuos de plaguicidas como con la producción integrada, así como de productos autorizados para esta producción integrada.

Los instrumentos jurídicos nacionales que se pueden encontrar relacionados con la contaminación de suelos son la Ley 10/1998 de 21 de abril²⁸, en sus artículos 27 y 28; el

RD 9/2005 de 14 de enero²⁹ donde se pueden encontrar los límites máximos de residuos (LMRs) de los contaminantes en el suelo, así como niveles genéricos de referencia (NGRs), mostrándose en la Tabla 4 algunos de los valores legislados.

Tabla 4. Listado de contaminantes y niveles genéricos de referencia para protección de la salud humana en función del uso del suelo.

Sustancia	Numero CAS	Uso industrial (mg/kg)	Uso doméstico (mg/kg)	Otros usos (mg/kg)
<i>p,p'</i> -DDE	72-55-9	60 ^a	6 ^a	0.6
<i>p,p'</i> -DDT	50-29-3	20 ^a	2	0.2
<i>p,p'</i> -DDD	72-54-8	70 ^a	7 ^a	0.7
Endosulfán	115-29-7	60 ^a	6 ^a	0.6
Hexaclorobenceno	118-74-1	1 ^a	0.1 ^a	0.01 ^b
Aldrin	309-00-2	1 ^a	01 ^a	0.01

^a En aplicación del criterio de contigüidad.

^b Límite inferior de detección.

Como se puede observar en la Tabla 4, se fijan unos niveles genéricos de referencia de plaguicidas en los suelos, mediante los que se puede determinar si un suelo está contaminado o no. De forma general se puede observar que para los plaguicidas los valores admitidos son relativamente altos, del orden de mg/kg, mientras que para algunos compuestos, se requieren valores bajos (10 µg/kg) como sucede para el aldrín y el hexaclorobenceno.

Además se puede observar que existen valores para contaminantes que ya están prohibidos, como por ejemplo el hexaclorobenceno ó los derivados del DDT (DDE, DDD). Su inclusión en dichas tablas se debe a que al ser plaguicidas muy persistentes y de lenta degradación, se encuentran frecuentemente en suelos por haberse aplicado

cuando fueron autorizados y permanecer en el suelo debida su gran estabilidad ó incluso debido al transporte desde otras zonas.

En relación a este Real Decreto existe una Guía Técnica de aplicación del mismo³⁰, donde se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, exponiendo los aspectos más relevantes y aclarando aquellas cuestiones que pueden resultar, a priori, más problemáticas a la vista de los comentarios y dudas que se han ido recogiendo durante su preparación y desde su entrada en vigor. Además, recientemente se ha aprobado la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados³¹.

En relación con la producción integrada, se puede destacar el Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas²⁷. Además existe un Registro de productos y material fitosanitario publicado en 2007³².

Todo este marco legislativo ha motivado un incremento en el estudio de la presencia de plaguicidas en el suelo. Así, resulta de gran interés el estudiar y determinar la cantidad de residuos de plaguicidas que se encuentran en este tipo de suelos debido a las aplicaciones de productos fitosanitarios que se han realizado. Adicionalmente, es importante tener información sobre tiempos de permanencia en el suelo sin que haya modificaciones en su composición, además de investigaciones sobre la posibilidad de contaminación de ecosistemas próximos (acuíferos) antes de su descomposición.

2.6. Análisis de residuos de plaguicidas en suelos.

Como se ha comentado anteriormente, el suelo es una matriz muy compleja y variada. Debido a los diferentes tipos de suelos existentes y a la gran cantidad de sustancias que conforman su matriz, su análisis no es un proceso sencillo.

La composición de un suelo agrícola depende principalmente del tipo de sólidos que lo constituyen, que varían según la zona en la que nos encontremos. Además, es práctica habitual la adición de materia orgánica que aporte nutrientes a las plantas (compost, estiércol, fertilizantes,...) y donde se encuentra la flora microbiana que se encarga de la degradación de los posibles contaminantes/plaguicidas existentes en el mismo.

En relación a la determinación analítica de este tipo de contaminantes en suelo, hay que decir que en relación al tratamiento de la muestra, se pueden aplicar varios tipos de técnicas de extracción como la extracción Soxhlet^{33,34}, la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos^{35,36,37}, la extracción con fluidos supercríticos³⁸ y la extracción con líquidos presurizados (PLE)^{39,40,41}, mostrándose esta última opción como una poderosa alternativa a la metodología tradicional Soxhlet, debido a la considerable reducción tanto del volumen de disolvente orgánico empleado durante la extracción, como del tiempo de dicha etapa.

Además, para la separación de los distintos compuestos objeto de análisis se suelen usar técnicas como la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)^{42, 43} y la cromatografía de gases (GC)⁴⁴. En cuanto al tipo de detección, se puede emplear el detector de diodos en fila (DAD)⁴⁵ o el detector de captura de electrones (ECD)⁴⁶, además de los detectores de espectrometría de masas (MS), que son ampliamente utilizados para el análisis de residuos de plaguicidas⁴⁶. Las técnicas de HPLC o GC acopladas con MS o con MS en tándem (MS/MS) son las técnicas más poderosas para la determinación de residuos de plaguicidas a niveles traza, proporcionando una alta selectividad y la sensibilidad, y se utilizan en el análisis de un amplio rango de las matrices. En este sentido, las técnicas de GC-MS/MS^{47,48} y HPLC/MS-MS^{49,50} son la primera opción para desarrollar métodos multi-residuo en los laboratorios de análisis, ya que ofrecen excelentes resultados debido a la gran sensibilidad, especificidad y con capacidad de confirmación.

3. Experimental.

En este Trabajo Fin de Máster y tal y como se indica en los objetivos del mismo, se ha llevado a cabo el tratamiento y el análisis de los datos experimentales obtenidos aplicando las metodologías analíticas descritas a continuación.

3.1 Reactivos y materiales.

Los patrones certificados de plaguicidas se obtuvieron de Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Alemania), Riedel-de-Haën (Seelze-Hannover, Alemania) y Chemservice (Milán, Italia). La cafeína marcada isotópicamente (^{13}C -cafeína) que se utilizó como estándar interno (IS), se obtuvo también de Dr. Ehrenstorfer GMBH. En todos los casos, las purezas siempre fueron $> 95\%$.

A partir de los patrones puros, se prepararon disoluciones individuales (disoluciones madre) de todos los compuestos por pesada del sólido o líquido y disolviéndolo en 50 mL de metanol (MeOH) para plaguicidas polares, y en 50 mL de acetona para los plaguicidas apolares. Las disoluciones se almacenaron bajo refrigeración ($T < 5^\circ\text{C}$).

A partir de las disoluciones individuales, se prepararon dos disoluciones intermedias de ambos tipos de plaguicidas (polares y apolares) por dilución apropiada de las disoluciones madre. La dilución se realizó con acetona para plaguicidas apolares (concentración de 2 mg/L para cada compuesto), y con MeOH para plaguicidas polares (concentración de 4 mg/L para cada compuesto). Ambas disoluciones se almacenaron bajo refrigeración ($T < 5^\circ\text{C}$).

Además se preparó una disolución de trabajo de ^{13}C -cafeína (20 mg/L) por dilución de la disolución madre con acetona y almacenada bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Los disolventes empleados se consiguieron de diferentes casas comerciales: MeOH (pureza HPLC, Sigma, St. Louis; MO, EE.UU.); acetato de etilo (EtAc, pureza para análisis de residuos, Riedel-de-Haën), *n*-hexano (pureza para el análisis de residuos J.T.Baker; Deventer, Holanda), acetona (grado de pureza para análisis) y ácido fórmico (Fluka, Seelze-Hannover, Alemania). Filtros de celulosa de 30 mm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) y Hydromatrix (Varian, Harbour City, CA; EE.UU.) se usaron para la extracción con líquidos presurizados.

Para llevar a cabo las extracciones mediante PLE, se utilizó un sistema de extracción acelerada ASE 100 (Dionex, Sunnyvale, CA, EEUU) equipado con celdas de extracción de acero inoxidable de 34 mL. Se usaron una balanza analítica AB204-S de Mettler Toledo (Greifensee, Suiza) y un rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Suiza) para la preparación de patrones y durante las extracciones.

3.2. Instrumentación analítica.

3.2.1. Determinación de plaguicidas apolares.

Para la determinación de los plaguicidas apolares, los análisis cromatográficos se realizaron mediante un sistema GC Varian 3800 (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con control electrónico de flujo (EFC) e interconectado a un espectrómetro de masas de QqQ 1200L.

Las muestras fueron inyectadas en un inyector SPI/1079 de *split/splitless* de temperatura programada con un automuestreador Combi Pal (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza) usando una jeringa de 100 µL. El inserto de vidrio fue equipado con un relleno de Carbofrit (Restek, Bellefonte, PA, EE.UU.).

Para la separación analítica se usó una columna capilar no tratada (2 m x 0.25 mm de diámetro interno, d.i.) de Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.) como pre-columna conectada a una columna capilar Factor Four VF-5ms (30 x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm de espesor de película) proporcionada por Varian. El gas portador fue helio (99.9999 %) a un flujo constante de 1 mL/min. Se usó argón (99.9999 %) como gas de colisión.

El espectrómetro de masas operaba en ionización electrónica (EI) a 70 eV. La calibración del equipo se realizó de forma semanal con perfluorotributilamina (PTFBA).

Para el control del instrumento y el análisis de los datos se usó el software de Varian Workstation (versión 6.9).

3.2.2. Determinación de los plaguicidas polares.

En el caso de los plaguicidas polares, los análisis cromatográficos fueron realizados con un sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MS, EE.UU.) y la separación cromatográfica se logró usando una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm tamaño de partícula) de Waters. La detección MS/MS fue llevada a cabo usando un espectrómetro de masas de QqQ Acquity TQD (Waters, Manchester, Reino Unido).

El instrumento operaba con una fuente de ionización de electronebulización (ESI) en modo positivo. La fuente ESI fue configurada con los siguientes parámetros: voltaje capilar 3.5 kV, voltaje extractor 5 V, temperatura de la fuente 110 °C, temperatura de desolvatación 350 °C, flujo de gas de cono 80 L/h y flujo de gas de desolvatación 600 L/h, se usó nitrógeno en ambos casos (> 95%). El proceso de disociación inducida por colisiones (CID) fue llevada a cabo con argón (99.9999%) como gas de colisión a una presión 4×10^{-3} mbar en la celda de colisión.

La adquisición de datos fue desarrollada usando el software MassLynx (Waters).

3.3. Extracción mediante PLE.

Para llevar a cabo la extracción mediante PLE, se pesaron 6 g de suelo seco en un mortero de cristal, se mezclaron con 3 g de Hydromatrix, para eliminar la humedad y facilitar la penetración del disolvente en la matriz, hasta obtener una mezcla homogénea. Se colocó un filtro de celulosa en el fondo de la celda de extracción. La mezcla fue introducida entonces en la celda, rellenando hasta el borde superior con Hydromatrix y cerrándola a continuación perfectamente.

Las muestras de suelos fueron extraídas con las condiciones mostradas en la Tabla 5. Los extractos fueron concentrados con un rotavapor a 45 °C y fueron evaporados a sequedad usando una corriente de nitrógeno. Los extractos concentrados se disolvieron en 1950 μL de EtAc y se adicionaron 50 μL de disolución de IS. A continuación se

tomó 1 mL para el análisis cromatográfico por GC-QqQ-MS/MS, mientras que otro mL se evaporó bajo corriente de nitrógeno para su posterior redisolución en 500 µL de MeOH y 500 µL de ácido fórmico al 0.01 % en agua ultrapura antes del análisis cromatográfico por UHPLC-QqQ-MS/MS.

Tabla 5. Condiciones de extracción fijadas PLE

Parámetro	Valor empleado
Disolvente	EtAc/MeOH (3:1,v/v)
Temperatura	85 °C
Presión	1500 psi
Tiempo pre-calentamiento	2 min
Tiempo estático	5 min
Volumen de enjuague	60%
Tiempo de purga	60 s
Nº ciclos	2

3.4. Análisis mediante GC-QqQ-MS/MS.

Se inyectaron alícuotas de 10 µL de extracto en el sistema de GC operando con una velocidad de flujo de la jeringa de 10 µL/s. La temperatura inicial del inyector de 70 °C se mantuvo durante 0.5 min y se incrementó a 100 °C /min hasta 310 °C, temperatura que se mantuvo durante 10 min. La relación de división del inyector fue establecida inicialmente a 30:1. El modo sin división fue activado desde los 0.5 min hasta los 3.5 min. A 3.5 min, la relación de *split* fue fijada a 100:1 y reducida a 20:1 en el minuto 10.

La temperatura del horno de la columna fue inicialmente fijada a 70 °C,

manteniéndose durante 3.5 min; entonces se incrementó a 35 °C/min hasta los 180 °C. Posteriormente, la temperatura se incrementó hasta 300 °C a 10 °C/min y se mantuvo durante 7 min. Para alcanzar la temperatura inicial del inyector lo más rápido posible y comenzar la siguiente inyección, se aplicó CO₂ como refrigerante criogénico cuando la temperatura del inyector era de 170 °C. El tiempo de análisis fue de 25.6 min.

El analizador QqQ operaba en MS/MS en modo SRM. El multiplicador fue fijado a +100 V por encima del valor óptimo indicado por el software del instrumento. Las temperaturas de la línea de transferencia, *manifold* y fuente de ionización se establecieron a 300 °C, 40 °C y 280 °C, respectivamente. Los valores óptimos para el tiempo de adquisición estuvieron en el rango de 0.264 a 0.504 s, proporcionando tiempos de adquisición desde 0.007 a 0.012 s. Se fijaron anchuras de pico de *m/z* 2.0 y 1.5 en el primer (Q1) y tercer (Q3) cuadrupolo, respectivamente, y el análisis fue realizado aplicando un retraso en el filamento de 5.5 min.

3.5. Análisis mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo usando un gradiente de elución con una fase móvil preparada con MeOH (eluyente A) y 0.01% (v/v) de ácido fórmico en agua (eluyente B). El análisis comenzó con un 10% del eluyente A, el cual fue incrementado linealmente hasta el 90% en 5 minutos. Esta composición se mantuvo en los siguientes minutos. Posteriormente, se incluyó un tiempo de re-equilibrado de 1.5 min, obteniendo un tiempo total de análisis de 9.5 min. El flujo fue de 0.35 mL/min y la temperatura de la columna se fijó a 35 °C. Se inyectaron alícuotas de 5 µL de extracto de muestra. El analizador de triple cuadrupolo operó en modo monitorización de reacciones múltiples (MRM).

3.6. Muestreo.

Las muestras se obtuvieron de 12 suelos de invernaderos de diferentes localidades de la provincia de Almería, donde se ha aplicado actividades de lucha integrada, cubriendo alrededor de 400 km². Las distintas localidades donde se realizó el muestreo fueron Adra, El Ejido, La Mojonera, Roquetas de Mar y Vícar, ya que están consideradas como

las áreas más importantes dedicadas a la agricultura intensiva en Almería. Los cultivos de las distintas plantaciones incluían pimiento, calabacín, berenjena, pepino y tomate. Los invernaderos muestreados tenían una superficie comprendida entre 6000 y 14000 m² cada uno. En cada uno de ellos se realizaron 5 tomas de muestra de 600-1000 g cada una, distribuidas de manera uniforme en el invernadero. Dichas muestras fueron tomadas cerca de la línea de riego a una profundidad de 5-15 cm, eliminando previamente la capa de arena usada en este tipo de producción agrícola. Se emplearon palas de acero inoxidable. Las distintas muestras tomadas de cada uno de los invernaderos se mezclaron para tener una muestra compuesta (3-5 kg), procediendo a su homogeneización. A continuación las distintas muestras se secaron a temperatura ambiente, y se tamizaron a través de un tamiz de 2 mm de tamaño, almacenándose a 4 °C en botes topacio hasta su análisis.

Cada invernadero se muestreó tres veces: septiembre 2009, octubre 2010 y marzo 2011.

4. Resultados y discusión.

Las muestras se obtuvieron de 12 suelos de invernaderos de diferentes localidades de la provincia de Almería, donde se han aplicado actividades de lucha integrada, mostrándose en la Tabla 6, el código de cada una de las muestras, así como la localidad donde se realizó el muestreo.

Tabla 6. Muestras evaluadas en el presente estudio.

Localidad	Muestra	Código Muestra	Localidad	Muestra	Código Muestra
El Ejido	0122	Eji0122	Matagorda	0221	Mat0221
El Ejido	0222	Eji0222	Matagorda	0321	Mat0321
El Ejido	0322	Eji0322	Roquetas de Mar	0322	Roq0322
El Ejido	0422	Eji0422	Norias de Daza	0123	Nor0123
El Ejido	0522	Eji0522	Roquetas de Mar	0126	Roq0126
Matagorda	0121	Mat0121	Vícar	0126	Vic0126

En la Tabla 7 se señalan los plaguicidas detectados, mostrándose el código utilizado en las distintas representaciones gráficas utilizadas en el presente Trabajo Fin de Máster, así como el LMR estipulado en el RD 9/2005.

Tabla 7. Plaguicidas detectados así como los LMRs establecidos por el RD 9/2005.

Plaguicida	Código	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ¹	Plaguicida	Código	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ¹
Bifentrin	1	NRD ²	Hexaclorobenceno	15	10
Bromopropilato	2	NRD	<i>o,p'</i> -DDD	16	NRD
Bupimirato	3	NRD	<i>p,p'</i> -DDD+ <i>o,p'</i> -DDT	17	700
Ciproconazol	4	NRD	<i>p,p'</i> -DDE	18	600
Difeconazol	5	NRD	Penconazol	19	NRD
Dimetomorf	6	NRD	Pentaclorobenceno	20	NRD
Dinifeconazol	7	NRD	Piridaben	21	NRD
Endosulfán α	8	600	Piriproxifen	22	NRD
Endosulfán β	9	600	Procimidona	23	NRD
Endosulfán éter	10	600	Propiconazol	24	NRD
Endosulfán sulfato	11	600	Tetraconazol	25	NRD
Etoprofos	12	NRD	Triadimefon	26	NRD
Feranimol	13	NRD	Imidacloprid	27	NRD
Fludioxonil	14	NRD			

¹ LMR fijado por el RD 9/2005

² NRD: No incluido en el RD 9/2005.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para las distintas muestras incluidas en este estudio, para los tres muestreos realizados.

Tabla 8. Concentraciones de los plaguicidas encontrados en los suelos analizados en los tres muestreos realizados ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Plaguicida	Eji0122	Eji0222	Eji0322	Eji0422	Eji0522	Mat0121	Mat0221	Mat0321	Roq0322	Nor0123	Roq0126	Vic0126
Bifentrin	8 (6) (36) ¹	² (-) (5)	9 (9) (21)	10 (4) (30)	38 (30) (0)	2 (<LOQ ³) (7)	<LOQ (0)		2 (<LOQ) (17)			
Bromopropilato	2 (-) (8)		11 (-) (16)	5 (-) (9)			- (5) (14)					
Bupimirato	2 (3) (-)		0 (14) (-)	- (-) (12)	- (84) (228)		- (-) (29)	0 (5) (72)				
Ciproconazol	- (-) (2)	- (-) (6)			36 (16) (7)	3 (-) (5)	- (-) (14)	7 (7) (7)		- (-) (19)		
Difeconazol					- (-) (7)					- (-) (10)		
Dimetomorf	185 (59) (87)		186 (55) (36)	208 (38) (51)	64 (23) (8)							
Dimifeconazol								- (-) (8)		- (-) (12)		- (-) (11)
Endosulfan α									- (-) (12)			
Endosulfan β	- (-) (25)					0 (62) (21)	- (-) (43)		- (-) (90)			
Endosulfan eter	5 (4) (17)	1 (3) (11)	2 (3) (8)	8 (-) (13)	22 (16) (11)	6 (11) (55)	- (9) (84)	3 (5) (6)	2 (7) (37)	11 (-) (9)		- (-) (9)
Endosulfan sulfato	- (-) (2)					- (-) (8)	- (-) (36)		0 (-) (14)			
Etoprofos						- (-) (6)						
Feranimol		- (-) (5)			19 (13) (0)							
Fludioxonil	4 (-) (10)				102 (48) (68)					10 (86) (-)		
Hexaclorobenceno	- (-) (4)			- (4)								
<i>o,p'</i> -DDD	2 (-) (4)	2 (2) (7)			4 (5) (-)			2 (2) (-)	0 (2) (-)			
<i>p,p'</i> -DDD+ <i>o,p'</i> -DDT									- (-) (8)			
<i>p,p'</i> -DDE	36 (33) (43)	42 (41) (127)	27 (23) (66)	34 (35) (36)	56 (52) (25)	6 (4) (14)	- (-) (5)	14 (14) (12)	10 (10) (13)	3 (-) (4)	- (-) (34)	- (-) (7)
Penconazol					- (-) (7)					- (-) (33)		
Pentaclorobenceno			- (-) (4)	- (4)								
Piridaben	- (-) (60)		- (-) (12)	- (27)								
Piriproxifen	- (-) (9)											
Procimidona	16 (-) (13)	25 (3) (5)		58 (-) (10)	337 (46) (16)	54 (5) (28)	- (<LOQ) (9)	10 (5) (8)	41 (5) (21)		- (-) (13)	- (-) (10)
Propiconazol										- (-) (38)		
Tetraconazol	2 (-) (9)							31 (97) (156)		- (-) (61)		
Triadimefon	2 (-) (10)	2 (-) (11)		10 (2) (8)	26 (18) (7)		- (6) (-)			3 (-) (35)		
Imidacloprid	(10) (3) (67)	<LOQ (-) (87)	- (-) (9)	48 (2) (78)	15 15 (30)	- (-) (46)	- (-) (38)	- (<LOQ)	25 (21) (118)	- (<LOQ)	- (12) (47)	- (17)

¹ Datos obtenidos en los tres periodos de muestreo: septiembre 2009 (octubre 2010) (marzo 2011).

² No detectado

³ Concentración inferior al límite de cuantificación (LOQ)

Los plaguicidas detectados se pueden dividir en persistentes (incluidos sus productos de transformación) y no persistentes, analizándose a continuación los resultados obtenidos en función de dicha clasificación.

4.1. Evaluación de la presencia de plaguicidas persistentes.

En primer lugar se evalúa la presencia de plaguicidas persistentes, observando su evolución con el tiempo, mostrando en las Tablas 9-11 los resultados obtenidos.

Tabla 9. Concentración de plaguicidas persistentes en las muestras analizadas durante el primer muestreo.

Muestra	Plaguicida		
	Endosulfán éter	<i>o,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE
Eji0122	5	2	36
Eji0222	1	2	42
Eji0322	2	ND	27
Eji0422	8	ND	34
Eji0522	22	4	56
Mat0121	6	ND	6
Mat0221	ND ¹	ND	ND
Mat0321	3	2	14
Roq0322	2	ND	10
Nor0123	11	ND	3
Roq0126	ND	ND	ND
Vic0126	ND	ND	ND
Media (µg/kg)	6.7	2.5	25.0
SD (µg/kg) ²	6.6	1.0	18.2

¹ ND: No detectado

² SD: Desviación estándar.

Tabla 10. Concentración de plaguicidas persistentes en las muestras analizadas durante el segundo muestreo

Muestra	Plaguicida			
	Endosulfán β	<i>o,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE	Endosulfán éter
Eji0122	ND	4	2	33
Eji0222	ND	3	2	41
Eji0322	ND	3	ND	23
Eji0422	ND	ND	ND	35
Eji0522	ND	16	5	52
Mat0121	62	11	ND	4
Mat0221	ND	9	ND	ND
Mat0321	ND	5	2	14
Roq0322	ND	7	2	10
Nor0123	ND	ND	ND	ND
Roq0126	ND	ND	ND	ND
Vic0126	ND	ND	ND	ND
Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	62	7.3	2.6	27
SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		4.6	1.3	17

Tabla 11. Concentración de plaguicidas persistentes en las muestras analizadas durante el tercer muestreo

Muestra	Plaguicida							
	Endosulfán α	Endosulfán β	Endosulfán éter	Endosulfán sulfato	Hexaclorobenceno	<i>o,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDD + <i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE
Eji0122	ND	25	17	2	4	4	ND	43
Eji0222	ND	ND	11	ND	ND	7	ND	127
Eji0322	ND	ND	3	ND	ND	ND	ND	66
Eji0422	ND	ND	13	ND	4	ND	ND	36
Eji0522	ND	ND	11	ND	ND	ND	ND	25
Mat0121	ND	21	55	8	ND	ND	ND	14
Mat0221	ND	43	84	36	ND	ND	ND	5
Mat0321	ND	ND	6	ND	ND	ND	ND	12
Roq0322	12	90	37	14	ND	ND	8	13
Nor0123	ND	ND	9	ND	ND	ND	ND	4
Roq0126	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34
Vic0126	ND	ND	9	ND	ND	ND	ND	7
Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	12	45	24	15	4	5.5	8	32
SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		32	25	15	0	2.1		35

Se puede observar que se detectan ocho plaguicidas persistentes de los cuales dos solo se detectan en un suelo muestreado por el cual no se puede estimar una desviación típica.

En primer lugar, se puede indicar que mientras que en el primer muestreo sólo se detectan tres plaguicidas persistentes en los suelos estudiados (endosulfán éter, *o,p'*-DDD y *p,p'*-DDE), en el segundo además de los detectados previamente, también se detectó endosulfán β , mientras que en el tercero se detectó un mayor número de compuestos, comentándose a continuación los principales resultados obtenidos para cada uno de los compuestos.

a) Endosulfán.

El uso de endosulfán está prohibido por el documento 2005/864/CE de la Comisión Europea de 2/11/2005 al incluirlo en su anexo I⁵¹. A pesar de su prohibición, este compuesto y sus productos de transformación han sido detectados en las muestras estudiadas, debido a su elevada persistencia. Así, se observa como en el primer muestreo, sólo se detecta endosulfán éter, mientras que en los muestreos posteriores, se detectan el resto de los productos de transformación. Además se puede observar que la concentración de endosulfán éter aumenta con el tiempo, así como para el endosulfán sulfato, que se detecta en el tercer muestreo, y podría explicarse como una transformación del endosulfán éter. De todas maneras, conviene indicar que los valores que se obtienen son mucho menores que los NGRs indicados por el RD 9/2005 (600 µg/kg).

Por otro lado, se puede indicar que en el 58.3 % de los suelos, el endosulfán éter se ha encontrado como único derivado del endosulfán α y se observa que en general su concentración ha aumentado con el tiempo.

Finalmente, se puede señalar que el endosulfán α solo se encuentra en un 8.3 % de los suelos, detectándose sólo en el tercer muestreo. Esta aparición se podría explicar bien por una reciente aplicación, a pesar de estar prohibido, o bien, por la adición al suelo de estiércol o compost que estuvieran previamente contaminados.

b) Hexaclorobenceno.

Este plaguicida sólo se encuentra en un 16.7 % de los suelos y sólo en las muestras procedentes del tercer muestreo. Esto puede ser debido al añadir algún tipo de suelo adicional o abono (estiércol) que estuviera contaminado con el plaguicida.

Además de todo esto se puede indicar que aunque se haya detectado, su concentración es inferior al NGR indicado en el RD 9/2005.

c) Derivados del DDT.

Como se puede observar en las Tablas 9-11, los principales productos de transformación del DDT detectados en los suelos analizados han sido *o,p'*-DDD y *p,p'*-DDE. Así, el *p,p'*-DDE se detecta en todas las muestras de suelos, mientras que el *o,p'*-DDD sólo se encuentra en 5 suelos y el *p,p'*-DDD sólo se detecta en un suelo durante el tercer muestreo (Roq0322), mientras que el compuesto original (*o,p'*-DDT) no ha sido detectado en ninguna muestra.

El *o,p'*-DDD se detecta en el 41.7 % de las muestras de suelo analizadas, observándose un aumento de la cantidad encontrada con el tiempo en dos muestras (Eji0122 y Eji0222) y en las otras tres (Eji0522, Mat0321 y Roq0322) se produce un descenso con el tiempo de este compuesto, aunque de forma general se observa como la concentración es muy baja ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$).

El *p,p'*-DDE se encuentra en todos los suelos analizados. Se observa también como en dos suelos, la cantidad de *p,p'*-DDE desciende con el tiempo (Eji0522 y Mat0321). En un 33.3 % de los suelos se encuentra que la cantidad de plaguicida desciende del primer muestreo al segundo, produciéndose un aumento en el último. También se observa como en el resto de muestras analizadas, la cantidad de *p,p'*-DDE se mantiene aproximadamente constante durante los tres muestreos. En general se puede indicar que la cantidad detectada en las muestras es menor al valor indicado en el RD 9/2005, de $600 \mu\text{g}/\text{kg}$. Se puede observar como en algunos suelos la cantidad ha aumentado pudiendo explicarse debido a desviaciones debidas al muestreo ya que generalmente las fincas no son totalmente regulares, estando divididas en secciones denominadas banales, muchas veces en pendiente. De esta forma, la toma de muestra se puede ver afectada por el efecto de la pendiente y de los riegos a lo largo del tiempo, haciendo que algunas zonas estén más expuestas a la irrigación y, por tanto, al movimiento de las materias activas presentes. Consecuentemente, a pesar de realizar la toma de muestra de manera representativa, es posible observar desviaciones de este tipo. Adicionalmente, resulta menos probable que este aumento de la concentración sea debido a la aplicación del propio plaguicida, dada la prohibición de su uso y comercialización. Otra posible causa puede deberse a la adición al suelo de sustancias contaminadas con este compuesto como pueden ser tierras procedentes de otras zonas contaminadas o compost contaminado, ya sea abono de explotaciones ganaderas o compost generado de la

degradación de restos de plantas que ya estaban contaminadas en este plaguicida y no se ha producido la degradación del plaguicida en la fermentación del compost.

A modo de resumen, en la Figura 4 se muestran los valores medios de los plaguicidas persistentes detectados en los suelos estudiados durante los tres muestreos (M1, M2 y M3).

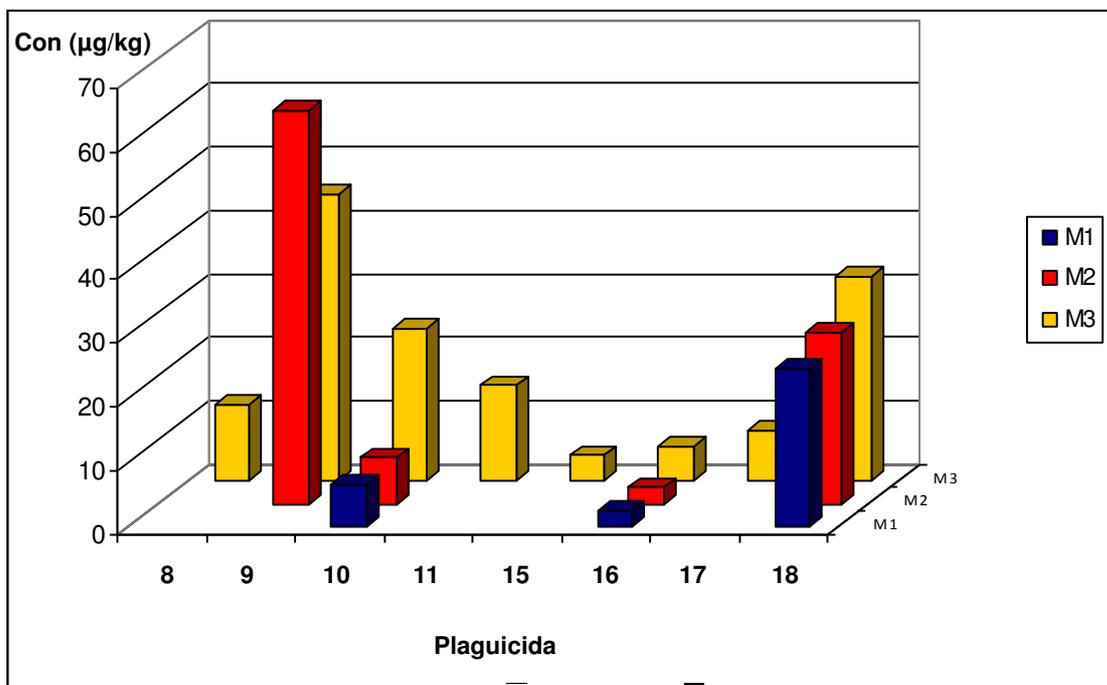


Figura 4. Valores medios (µg/kg) de los plaguicidas persistentes durante los tres muestreos. Abreviaturas: M1: Muestreo realizado en Septiembre de 2009; M2: Muestreo realizado en Octubre de 2010; M3: Muestreo realizado en marzo de 2011.

Se puede observar que algunos de los productos de transformación de los plaguicidas persistentes aumentan durante los tres muestreos realizados, indicando que aunque los productos “padre” se añadieron hace tiempo, debido a su elevada persistencia, aún se están produciendo procesos de transformación de los mismos, observándose mayores concentraciones en el tercer muestreo.

Si los resultados obtenidos se comparan con estudios previos, se puede observar que mientras que en un estudio realizado en Galicia⁵², el hexaclorobenceno es el plaguicida más comúnmente detectado, en el estudio realizado en Almería, sólo ha sido detectado

en una muestra. También en el sur español se han realizado varios estudios, en los que se evaluó la presencia de DDTs tras su prohibición, observando una considerable reducción de dichos compuestos, ya que se han pasado de valores que oscilaban entre 3.5-46 mg/g a valores comprendidos entre 0.08-11.1 mg/g, observándose mayores concentraciones en suelos dedicados al cultivo de arroz que en suelos donde se cultivaba olivar(19).

Finalmente, y en el plano internacional, se puede destacar un estudio llevado a cabo en China, donde se ha observado que tanto DDT como hexaclorobenceno han sido los compuestos más detectados⁵³, aunque en Shanghai además se detectaron endosulfán y DDT, expresado como suma de *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT⁵⁴.

4.2. Evaluación de la presencia de plaguicidas no persistentes.

Una vez evaluada la presencia de plaguicidas persistentes, se muestran a continuación los resultados de los plaguicidas no persistentes (Tablas 11-13).

Tabla 11. Plaguicidas no persistentes detectados en la toma de muestra 1.

Plaguicidas	Eji122	Eji222	Eji322	Eji422	Eji522	Mat121	Mat221	Mat321	Roq322	Nor123	Roq126	Vic126	Media	SD
Bifentrin	8	ND	9	10	38	2	ND	ND	2	ND	ND	ND	12	13
Bromopropilato	2	ND	11	5	ND	6.5	6.4							
Bupimirato	2	ND	2											
Ciproconazol	ND	ND	ND	ND	36	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	23
Difeconazol	ND	7	ND	ND	ND	ND	7							
Dimetomorf	185	ND	186	208	64	ND	161	65						
Feranimol	ND	ND	ND	ND	19	ND	19							
Fludioxonil	4	ND	ND	ND	102	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	39	55
Procimidona	16	25	ND	58	337	54	ND	10	41	ND	ND	ND	77	116
Tetraconazol	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31	ND	ND	ND	ND	17	21
Triadimefon	2	2	ND	10	26	ND	ND	ND	ND	3	ND	ND	8.6	10
Imidacloprid	10	ND	ND	48	15	ND	ND	ND	25	ND	ND	ND	25	17

Tabla 12. Plaguicidas no persistentes detectados en la toma de muestra 2.

Plaguicidas	Eji122	Eji222	Eji322	Eji422	Eji522	Mat121	Mat221	Mat321	Roq322	Nor123	Roq126	Vic126	Media	SD
Bifentrin	6	ND	9	4	30	ND	12	12						
Bromopropilato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND	5	
Bupimirato	3	ND	14	ND	84	ND	ND	5	ND	ND	5	ND	22	35
Ciproconazol	ND	ND	ND	ND	16	ND	ND	7	ND	ND	7	ND	10	5,2
Dimetomorf	59	ND	55	38	23	ND	44	17						
Feranimol	ND	ND	ND	ND	13	ND	13							
Fludioxonil	ND	ND	ND	ND	48	ND	ND	ND	ND	86	ND	ND	67	27
Pentaclorobenceno	ND	ND	ND	4	ND	4								
Piridaben	ND	ND	ND	27	ND	27								
Procimidona	ND	3	ND	ND	46	5	ND	5	5	ND	ND	ND	13	19
Tetraconazol	ND	97	ND	ND	ND	ND	97							
Triadimefon	ND	ND	ND	2	18	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND	8.7	8.3
Imidacloprid	3	ND	ND	2	15	ND	ND	ND	21	ND	12	ND	11	8.1

Tabla 13. Plaguicidas no persistentes detectados en la toma de muestra 3.

Plaguicidas	Eji122	Eji222	Eji322	Eji422	Eji522	Mat121	Mat221	Mat321	Roq322	Nor123	Roq126	Vic126	Media	SD
Bifentrin	36	5	21	30	ND	7	ND	ND	17	ND	ND	ND	19	12
Bromopropilato	8	ND	16	9	ND	ND	14	ND	ND	ND	ND	ND	12	3.9
Bupimirato	ND	ND	ND	ND	228	ND	29	72	ND	ND	ND	ND	110	105
Ciproconazol	2	6	ND	ND	7	ND	14	7	ND	19	ND	ND	9.2	6.2
Difeconazol	ND	ND	ND	ND	7	5	ND	ND	ND	10	ND	ND	7.3	2.5
Dimetomorf	87	ND	36	51	8	ND	46	33						
Dinifeconazol	ND	8	ND	12	ND	11	10	2.1						
Etoprofos	ND	ND	ND	ND	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6	
Feranimol	ND	5	ND	5										
Fludioxonil	10	ND	ND	ND	68	ND	39	41						
Penconazol	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	33	ND	ND	20	18
Pentaclorobenceno	ND	ND	4	ND	4									
Piridaben	60	ND	60											
Piriproxifen	9	ND	9											
Procimidona	13	5	ND	10	16	28	9	8	21	ND	13	10	13	6.8
Propiconazol	ND	38	ND	ND	38									
Tetraconazol	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	156	ND	61	ND	ND	75	75
Triadimefon	10	11	ND	8	ND	ND	ND	ND	ND	35	ND	ND	16	13
Imidacloprid	67	87	9	78	ND	46	38	ND	118	ND	47	17	56	35

En la Tabla 11 se puede observar que se han encontrado 12 plaguicidas no persistentes en el primer muestreo, siendo la procimidona el detectado a mayor concentración (337 µg/kg en la muestra de Eji0522). Además se puede indicar que en un 25 % de los suelos, sólo se ha detectado un plaguicida.

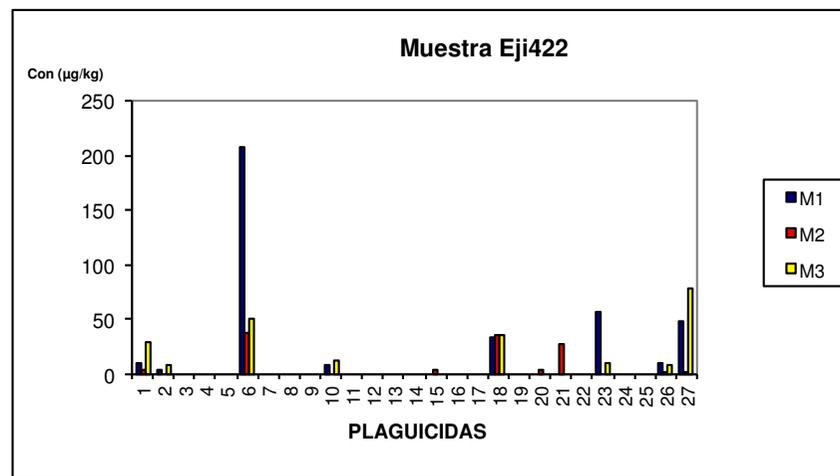
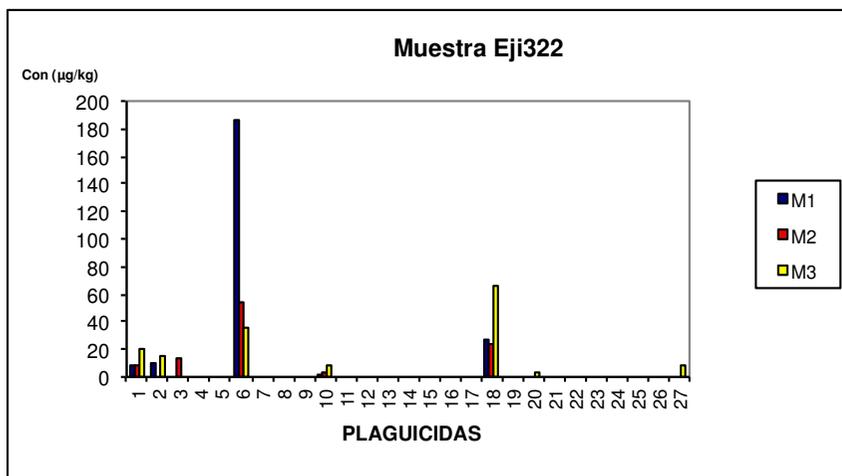
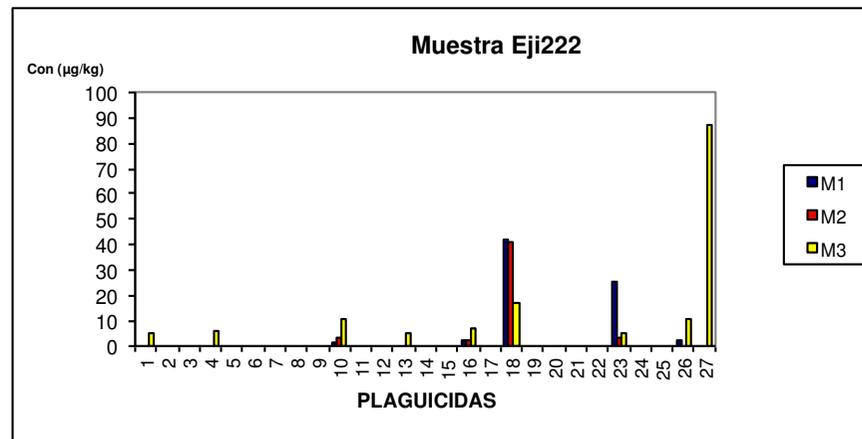
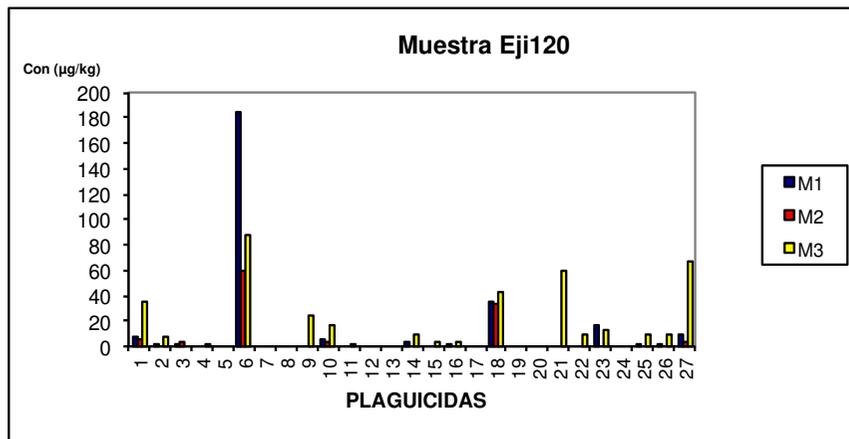
En el segundo muestreo realizado, se han encontrado 13 plaguicidas no persistentes, y en un 41.7 % de los suelos analizados, sólo un plaguicida ha sido detectado. De forma general, los niveles de plaguicidas detectados en este segundo muestreo son inferiores a los del primero.

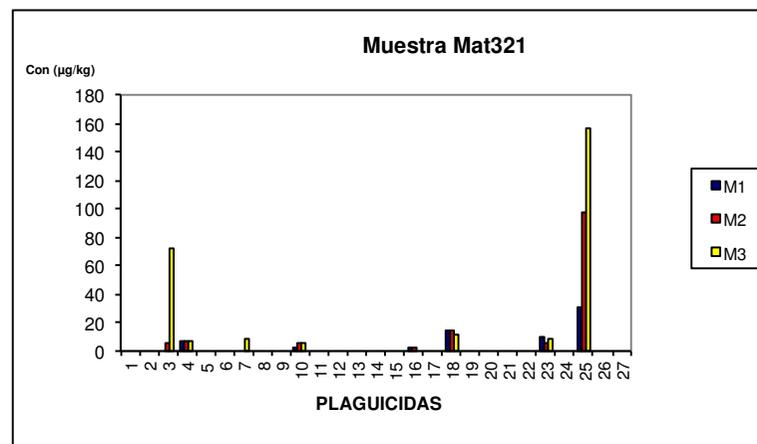
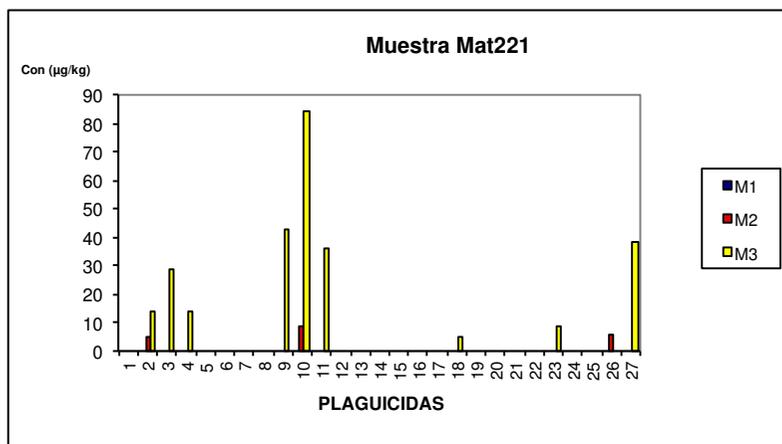
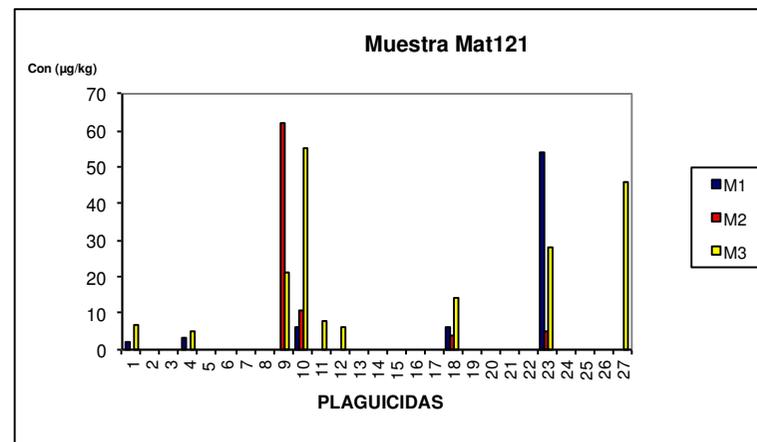
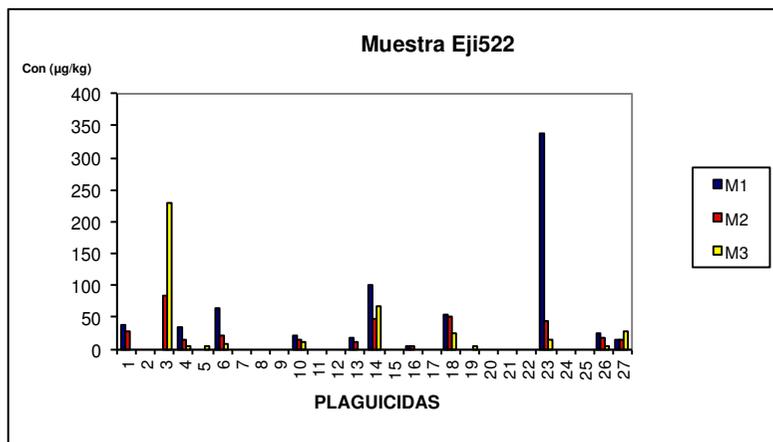
Finalmente, en el tercer muestreo, se han detectado 19 plaguicidas no persistentes, y en un 50% de los suelos sólo se ha encontrado un plaguicida. Además, el plaguicida encontrado a mayor concentración ha sido bupimirato, con una concentración de 228 µg/kg en la muestra Eji0522.

Si se observan los valores medios obtenidos, se puede observar que los mayores valores se obtienen en el primer y tercer muestreo, mientras que en el segundo dichos valores suelen ser inferiores. Esto puede estar relacionado con la época de muestreo, ya que tanto el primer y tercer muestreo se realizaron al comienzo de la campaña, donde es habitual comenzar con aplicación de plaguicidas antes de la siembra y antes de la germinación completa de la planta, mientras que el segundo muestreo fue llevado a cabo al final de la primera parte de la campaña, donde se está recogiendo fruto y no se suele aplicar ningún plaguicida.

En general, se observa una mayor variación de los niveles de concentración encontrados en relación a los plaguicidas persistentes, debido a que la mayoría de estos sí han podido ser utilizados entre los distintos muestreos realizados, no solamente en los cultivos existentes durante la etapa de muestreo, sino en los inmediatamente anteriores.

A continuación se muestran para cada muestra los plaguicidas detectados en los tres muestreos.





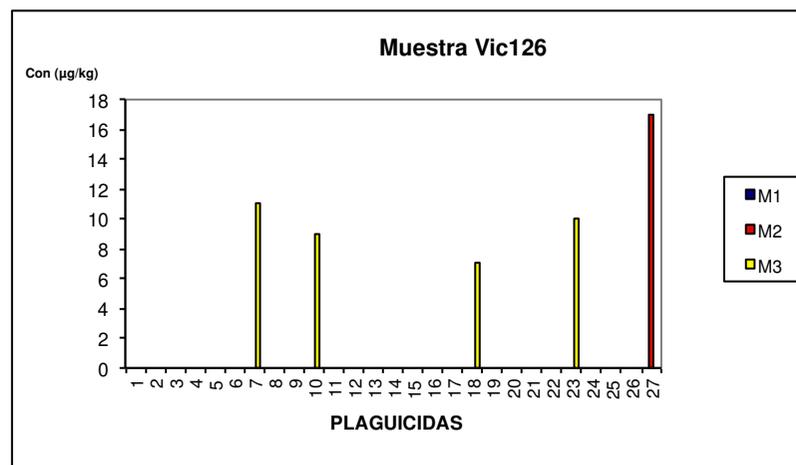
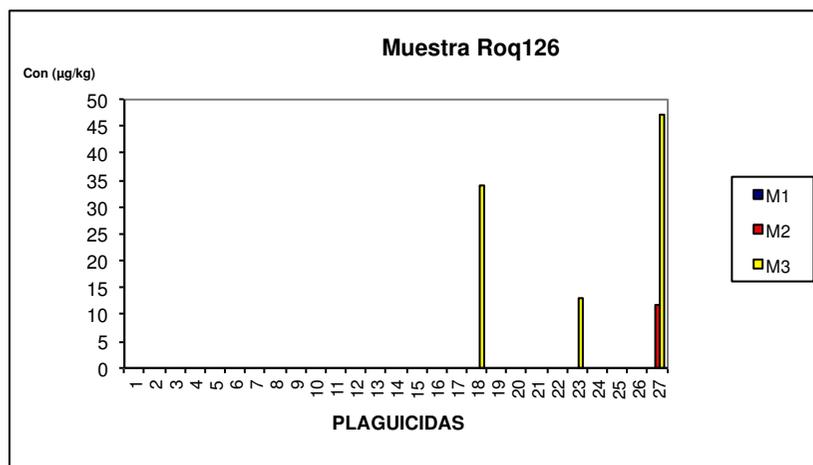
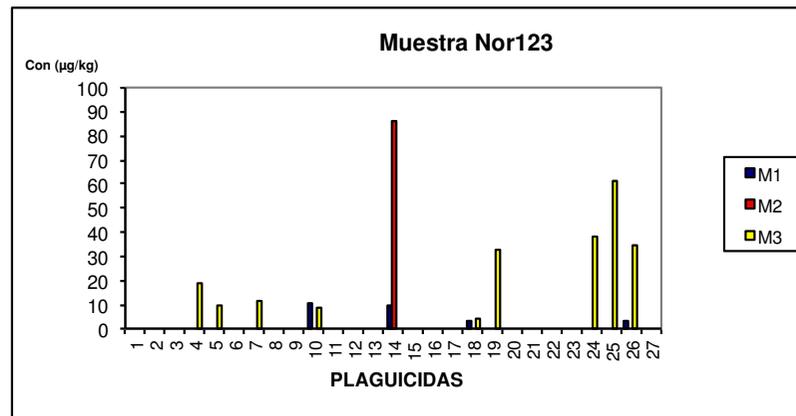
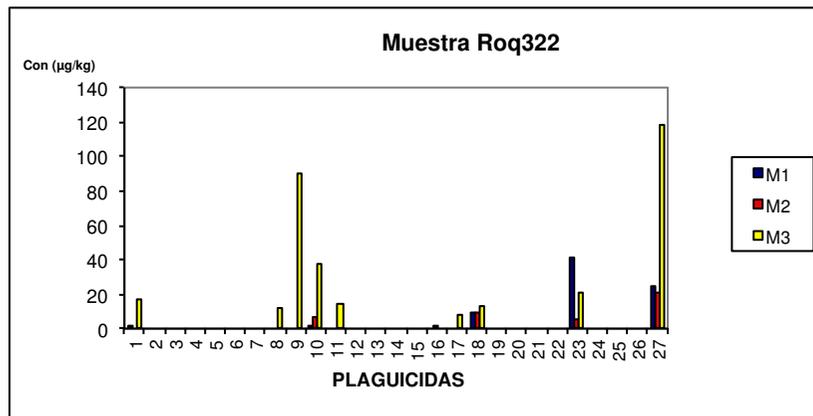


Figura 5.- Presencia de plaguicidas en las distintas fincas muestreadas. Los códigos de los plaguicidas son los indicados en la Tabla 7.

Considerando las figuras antes expuestas, se puede comentar lo siguiente:

- Plaguicidas en la muestra de suelo Eji120.

El plaguicida que se detecta a mayor concentración es el dimetomorf. También se detectan plaguicidas que están incluidos en el RD 9/2005 como es el endosulfán β , endosulfán éter, endosulfán sulfato, *o,p'*-DDD y *p,p'*-DDE con valores inferiores a los LMR indicados en el RD 9/2005.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Eji222

Los plaguicidas que se detectan a mayor concentración son endosulfán éter, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, procimidona y imidacloprid. De los plaguicidas que están en el listado del RD 9/2005 como son el endosulfán éter y *p,p'*-DDE los valores obtenidos son mucho menores a los LMRs indicados en el RD 9/2005.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Eji320

Como se puede observar el plaguicida a mayor concentración es el dimetomorf y *p,p'*-DDE, pero además se detectan los plaguicidas bifentrin, bromopropilato, bupimirato y endosulfán éter con valores menores a los anteriormente mencionados. De los plaguicidas que aparecen en el RD aparecen el *p,p'*-DDE y endosulfan éter con valores mucho menores al LMR indicado en el RD.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Eji422.

Se puede observar que los plaguicidas presentes a mayor concentración son dimetomorf, *p,p'*-DDE, procimidona y imidacloprid, donde el *p,p'*-DDE aparece en el RD 9/2005 y tiene un valor mucho menor que el LMR indicado en el RD 9/2005 (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

- Plaguicidas en la muestra de suelo Eji522.

Los plaguicidas que se detectan a mayor concentración son bifentrin, bupimirato, dimetomorf, procimidona imidacloprid y fludioxonil que no aparecen en el RD pero también se detectan otros plaguicidas como el *p,p'*-DDE y endosulfan éter que si están en el RD, con valores inferiores a los indicados en el LMR del RD 9/2005.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Mat121.

Se detectan plaguicidas como son el endosulfán β , endosulfán éter y *p,p'*-DDE que aparecen en el RD 9/2005, a concentraciones inferiores al LMR indicado en el RD

9/2005. También se detectan otros plaguicidas como el procimidona y imidacloprid que no se encuentran incluidos en el RD 9/2005.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Mat221.

De los plaguicidas que aparecen en el RD 9/2005, los que más se detectan son endosulfán β , endosulfán éter y endosulfán sulfato con valores inferiores al LMR del RD 9/2005, y otros no incluidos en la legislación como bromopropilato, bupimirato, ciproconazol, procimidona y imidacloprid.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Mat321.

Se detectan plaguicidas de los que se encuentran en el RD 9/2005 como endosulfán éter y *o,p'*-DDD con valores inferiores a los del RD 9/2005, pero principalmente se encuentran el bupimirato y tetraconazol con valores superiores a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Roq322.

Se detectan plaguicidas que están en el RD 9/2005 como el endosulfán α , endosulfán β , endosulfán éter, endosulfán sulfato y *p,p'*-DDE, pero con valores muy inferiores a los indicados en el RD 9/2005. También se detectan plaguicidas como el bifentrin, procimidona y imidacloprid que no están en el RD.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Nor123.

Se detectan plaguicidas del RD 9/2005 como el endosulfán éter y *p,p'*-DDE con valores inferiores en relación al LMR del RD 9/2005. Los que presentan concentraciones superiores a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ son de los que no se encuentran recogidos en el RD 9/2005 como el fludioxonil, pentaclorobenceno, propiconazol, tetraconazol, triadimefon principalmente con valores mas elevados y también hay otros como el ciproconazol, difeconazol y dinifeconazol.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Roq126.

Se puede observar que no se detectan plaguicidas excepto el *p,p'*-DDE que parece en el RD 9/2005 con valores inferiores al LMR del RD 9/2005, encontrándose mayores concentraciones del imidacloprid.

- Plaguicidas en la muestra de suelo Vic126.

Se observa que no se detectan muchos plaguicidas, y en concentraciones menores a

otros suelos estudiados, de los que aparecen en el RD 9/2005 son el endosulfán éter y *p,p'*-DDE con valores muy inferiores a los indicados en el RD 9/2005, encontrándose mayores concentraciones de dinifeconazol, procimidona y imidacloprid .

5. Conclusiones y propuestas de trabajo futuras.

Las principales conclusiones que se pueden obtener del presente estudio son:

- Se ha demostrado la presencia de plaguicidas persistentes como *p,p'*-DDE, endosulfán y hexaclorobenceno. A pesar de la prohibición de DDT y endosulfán, debido su persistencia se detectan productos de transformación de los mismos, aunque a bajas concentraciones.
- También se observa que la concentración de los plaguicidas detectados y recogidos en el RD 9/2005, es inferior al valor de LMR que se indica en el citado Real Decreto.
- Los plaguicidas no persistentes detectados a mayor concentración de manera general son el imidacloprid (presente en casi todos los suelos analizados) y la procidimiona.
- En el tercer muestreo se han encontrado mayores concentraciones de algunos plaguicidas (mayoritariamente no persistentes), indicando su posible uso entre las fechas en las que se realizaron los muestreos.
- Entre los distintos municipios, se puede observar que las muestras de El Ejido son las que presentan unos mayores niveles de concentración de los plaguicidas detectados.

Teniendo en cuenta estas conclusiones, se proponen las siguientes actuaciones de trabajo futuras:

- ☞ Ampliación del número de muestras para incrementar la población bajo estudio, por ejemplo, a zonas del levante almeriense, donde también existen amplias zonas dedicadas a agricultura intensiva.
- ☞ Análisis de los suelos en diferentes profundidades para observar el posible perfil de los plaguicidas en el suelo.
- ☞ Análisis de suelos en los que se tiene en cuenta las posibles modificaciones que se han hecho al suelo como la adicción de fertilizantes orgánicos (compost, abono, agua,..).
- ☞ Comparación de suelos de invernaderos en los que se realiza un cultivo tradicional y cultivo de control biológico para observar la diferencia de concentración de plaguicidas encontrados, el tipo de plaguicidas y su persistencia.

6. Referencias.

- ¹ <http://www.rae.es/rae.html> (último acceso enero 2012)
- ² Gupta, S.K., Kincaid, C.T., Mayer, P.R., Newbill, C.A. Cole. C.R. A multidimensional finite element code for the analysis of coupled fluid, energy and solute transport, Battelle Pacific Northwest Laboratory pn1-2939, EPA contract 68-03-3116 (1982).
- ³ Fassbender, H.W., Bornermisza, E. IICA Química de Suelos con Énfasis e Suelos de América Latina, San José, Costa Rica, 1987.
- ⁴ Alexander M. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT editor S.A., México, 1980.
- ⁵ Burgues, A. Microorganisms in the soil, Hutchinsen & Co., Londres, 1958.
- ⁶ <http://edafologia.ugr.es/conta/tema13/evol.htm> (último acceso enero 2012)
- ⁷ Foro, H.D.. Fundamentos de la ciencia del suelo. Compañía Editorial Continental S.A.1996.
- ⁸ Fuentes Yagüe, J.L.. Manual práctico sobre la utilización de suelos y fertilizantes. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Ediciones Mundi Prensa, 1999.
- ⁹ Fuentes Yagüe, J.L.. El suelo y los fertilizantes. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Ediciones Mundi Prensa, 1994.
- ¹⁰ Máster “Control de residuos de plaguicidas y contaminantes: control alimentario y ambiental” Asignatura “Aplicaciones y tendencias” (2011-2012).
- ¹¹ <http://www.Ecifm.Rdg.Ac.Uk/Pesticides.Htm>. (último acceso enero 2012)
- ¹² http://www.Agf.Gov.Bc.Ca/Pesticides/C_2.Htm (último acceso enero 2012)
- ¹³ Navarro Garcia, S., Barba, A., Camara, M.A., Navarro, S. Persistencia de los plaguicidas en los suelos agrícolas. Procesos y factores condicionantes. Universidad de Murcia. Colección Blanca. 1992:32.
- ¹⁴ Olea, N., Fernández, M.F. Plaguicidas persistentes. Laboratorio de investigaciones médicas, Hospital Clínico Universidad de Granada. Congreso implementación del

convenio de contaminantes orgánicos persistentes Madrid, 26-27 de noviembre de 2001:1-6.

¹⁵ <http://edafologia.ugr.es/conta/tema13/persist.htm> (último acceso enero 2012)

¹⁶ Waliszewski, S.M., Infanzón, R.M. Diferencias en concentración de plaguicidas organoclorados persistentes en suelo, paja y granos de trigo. Revista internacional de contaminación ambiental. 2003;19(1):5-11.

¹⁷ Ramírez, J. A., Lacasaña, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición Arch. Prev. Riesg. Labor. 2001;4(2):67-75.

¹⁸ Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Secretary General of the United Nations, 22 May (2001). <http://www.pops.int> (último acceso enero 2012).

¹⁹ Muñoz-Arnanz, J., Jiménez, B. New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from south-western Spain. Environ. Pollut.. 2011;159:3640-3646.

²⁰ <http://edafologia.ugr.es/conta/tema13/factor.htm> (último acceso enero 2012)

²¹ <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf> (último acceso enero 2012)

²² www.atsdr.cdc.gov/esphs/es_phs35.html. (último acceso enero 2012)

²³ <http://edafologia.ugr.es/conta/tema13/imagenes/ddt.gif> (último acceso enero 2012)

²⁴ www2.ine.gb.mx.html (último acceso enero 2012)

²⁵ http://www.infoagro.com/abonos/control_biologico.htm (último acceso enero 2012)

²⁶ Bajwa, W.I., Kogan, M. “Compendium of IPM definitions. What is IPM and how is it defined in the worldwide literature? Integrated Plant Protection Center (IPPC). Oregon State University, Corvallis. Publication number 2002. 998.

²⁷ Real Decreto 1201/2002, de 20 de Noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. B.O.E. nº 287 de 30 de noviembre de 2002.

²⁸ Ley 10/1998 de 21 de abril de residuos y sus modificaciones. B.O.E. nº 96 de 22 de abril de 1998.

²⁹ RD 9/2005, de 14 de enero por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. B.O.E nº 15 de 18 de enero de 2005.

³⁰Ministerio de medio ambiente, medio rural y marino. Guía técnica de aplicación del RD 9/2005, de 14 de Enero por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, 2007. http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/suelos/otras_info_suelos/pdf/guia_tecnica_contaminantes_suelo_declaracion_suelos.pdf (último acceso enero 2012).

³¹ Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. B.O.E. nº 181 de 29 de julio de 2011.

³² Registro de productos y material fitosanitario: otros medios de defensa fitosanitaria(OCB) conforme a la orden APA/1470/2007, de 24 de mayo. B.O.E. nº 128 de 29 de mayo de 2007.

³³ El-Saeid, M.H., Al-Wabel, M.I., Abdel-Nasser, G., Al-Turki, A.M., Al-Ghamdi, A.G. One-step extraction of multiresidue pesticides in soil by microwave-assisted extraction technique. *J. Applied Sci.*, 2010; 10: 1775-1780.

³⁴ Slizovskiy, I.B., White, J.C., Kelsey, J.W. Evaluation of extraction methodologies for the determination of an organochlorine pesticide residue in vegetation. *Int. J. Phytoremediat.*. 2010;12(8):820-32.

³⁵ Lu, J. , Shi, R., Cai, Y., Liu, Y., Wang, Z., Feng, J., Zhao, M. Assessment of 20 organochlorine pesticides (OCPs) pollution in suburban soil in Tianjin, China. *B. Environ. Contam. Tox.*. 2010;85(2):137-41.

³⁶ Tadeo, J.L. , Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A.I. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *J. Chromatogr. A* .2010;1217(16):2415-40.

- ³⁷ Ramos, J.J., Rial-Otero, R., Ramos, L., Capelo, J.L. Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. *Anal. Chim. Acta*. 2011;702(2):274-279.
- ³⁸ Yoshida, T., Murakawa, H., Fukushima, K., Yoshimoto, H., Tobino, T. Analytical method of solids for residual organochlorine pesticides with supercritical fluid extraction. *Jpn. Soc. Anal. Chem.* 2009;58(11):931-936.
- ³⁹ Hussien, A., Westbom, R., Megersa, N., Mathiasson, L., Björklund, E. Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *J. Chromatogr. A*. 2007;1152(1-2):247-253.
- ⁴⁰ Concha-Graña, E., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D. Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils. *J. Chromatogr. A*, 2004;1047(1-20): 147-155.
- ⁴¹ Moreno, D.V., Ferrera, Z.S., Rodríguez, J.J.S., Aixalà, E.P., Ballarín, F.B. Determination of organochlorine pesticides from agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Soil Sediment Contam.* 2007;17:1-11.
- ⁴² Díaz-Bautista, M.A., Torres, T., Ortiz, J.E., Reyes, J., Illari, A. Martín-Rubi, J.A., Canoira, L. Determination of organic compounds for the study of contaminated soils: Design of analytical procedures for its adequation to the new spanish legislation (R.D. 9/2005). *Bol. Geol. Miner.* 2007;118(1):91-104.
- ⁴³ Marchese, S., Perret, D., Gentili, A., Curini, R., Marino, A. Development of a method based on accelerated solvent extraction and liquid chromatography/mass spectrometry for determination of arylphenoxypropionic herbicides in soil. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001;15(6):393-400.
- ⁴⁴ Yan, Z., Zhang, Y., Feng, T., Zhou, W., Ma, X. Determination of residues of organochlorine pesticides in soil by capillary gas chromatography. *Chem. J. on Internet* .2002;4(11):43-48.
- ⁴⁵ Sanchez-Rasero, F., Matallo, M., Peña, A., De La Colina, C., Dios, G.C., Romero, E.

Liquid chromatographic determination of methabenzthiazuron in soil aqueous solutions with photodiode-array detection, *J. Chromatogr. A.* 1999;733(1–2):367-370

⁴⁶ Zhu, H., Liu, W., Ding, X., Zhao, Z. Determination of 23 organochlorine pesticides in soil and sediment by gas chromatography coupled with dual columns and dual electron capture detectors. *Chinese J. Chromatogr.* 2011;9(08):773-780.

⁴⁷ Jia, L., Deng, Y. Determination of organochlorine pesticides in soils using a gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese J. Chromatogr.* 2010;26 (6):697-703.

⁴⁸ Zhang, P., Hu, X., Wang, Y., Sun, T. Simultaneous determination of 15 organochlorine pesticide residues in soil by GC/MS/MS. 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE. 2008; 4535409:4113-4116.

⁴⁹ Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C.M., Flores, P. Multiresidue analysis of pesticides in soil by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2009;92(5):1566-1575.

⁵⁰ Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta* 2008;75 (1):284-293.

⁵¹ Decisión 2005/864/CE del 2/11/2005 (DO: L317/25/2005) sobre la no inclusión del endosulfán en el anexo 1 de la Directiva 91/414/CEE y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa

⁵² R. Calvelo Pereira, M.C. Monterroso Martínez, A. Martínez Cortizas, F. Macías Analysis of composition, distribution and origin of hexachlorocyclohexane residues in agricultural soils from NW Spain. *Sci. Total Environ.* 2010; 408:5583-5591.

⁵³ Hu, G.J., Chen, S.L., Zhao, Y.G., Sun, C., Li, J., Wang, H. Persistent toxic substances in agricultural soils of Lishui county, Jiangsu province, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2009;82:48-54.

⁵⁴ Jiang, Y.F., Wang, X.T., Jia, Y., Wang, F., Wu, M.H., Sheng, G.Y., Fu, J.M.. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticides in agricultural soil of Shanghai, China. *J. Hazard. Mater.* 2009;170:989-997.