

PROV. T-15/134

T  
15  
52

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Departamento de Química Analítica**

***METODOS MULTIRRESIDUOS DE ANALISIS DE  
PESTICIDAS EN FRUTAS Y HORTALIZAS. METODOS DE  
IDENTIFICACION.***

**Ana Agüera López**  
**TESIS DOCTORAL**  
**Granada 1995**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
Nº Documento 219671891  
Nº Copia 21220414


FOR THE BOARD OF DIRECTORS  
OF THE  
AMERICAN  
OVERSEAS BUILDING SOCIETY  
INCORPORATED



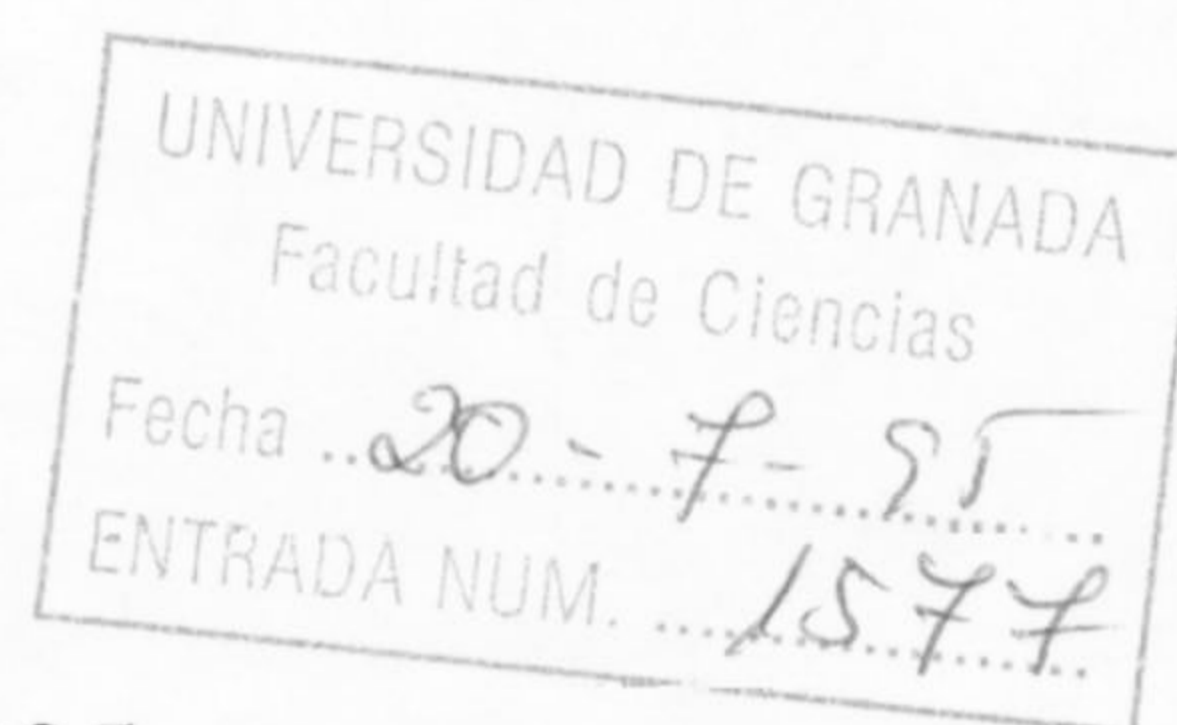
**METODOS MULTIRRESIDUOS DE ANALISIS DE PESTICIDAS EN FRUTAS  
Y HORTALIZAS. METODOS DE IDENTIFICACION.**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias (Sección Químicas) por

**ANA AGÜERA LOPEZ**



Fdo. Ana Agüera López



Visado en Granada a 4 de Julio de 1995

**LOS DIRECTORES DE LA TESIS**



Prof. Dr. D. Amadeo R. Fernández-Alba  
Profesor Titular del Departamento de  
Hidrogeología y Química Analítica.  
Facultad de Ciencias Experimentales.  
Universidad de Almería.



Prof. Dr. D. Antonio Valverde García  
Profesor Titular del Dpto. de Química  
Física, Bioquímica y Química Inorg,  
Facultad de Ciencias Experimentales  
Universidad de Almería.



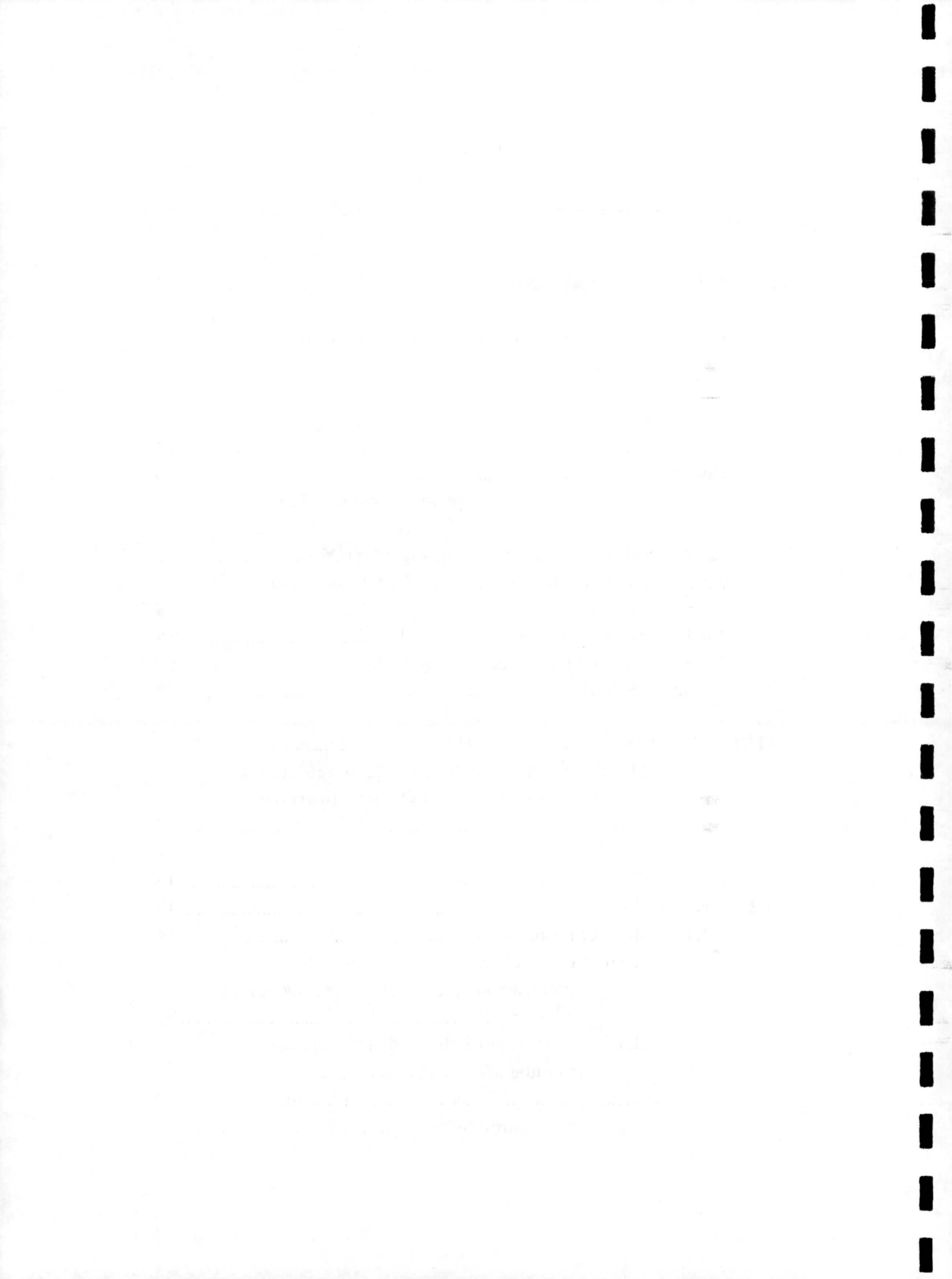
Very faint, illegible text at the bottom of the page, possibly bleed-through from the reverse side. The text is too light to transcribe accurately.



## INDICE

<b>OBJETIVOS</b>	.....	1
<b>CAPITULO I</b>	<b>Introducción general.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPITULO II</b>	<b>Materiales, reactivos, disoluciones y equipos utilizados.....</b>	<b>31</b>
2.1	Reactivos.....	33
2.2	Materiales.....	33
2.3	Disoluciones empleadas.....	36
2.3.1.	Análisis de pesticidas Organofosforados (OPs). .....	36
2.3.2.	Análisis de pesticidas Organoclorados (OCs).....	37
2.3.3.	Análisis de Imidacloprid y N-Metilcarbamatos (NMCs) por HPLC.....	38
2.3.4.	Análisis de benzoilfenilureas (BPU).....	38
2.3.5.	Análisis de Procimidona por inmunoensayo.....	39
2.4	Instrumentación.....	39
<b>CAPITULO III</b>	<b>Desarrollo de un Método Multirresiduos (MMRs) para el análisis de 25 plaguicidas Organofosforados (OPs) en matrices vegetales.....</b>	<b>43</b>
3.1	Introducción.....	45
3.2	Métodos Experimentales.....	49
3.2.1	Análisis cromatográfico.....	50
3.2.1.1	Aplicación de un método de optimización secuencial a la resolución de los 25 OPs.....	50
3.2.1.2	Confirmación del método cromatográfico.....	52
3.2.1.3	Selección de un compuesto para su uso como patrón interno.....	52



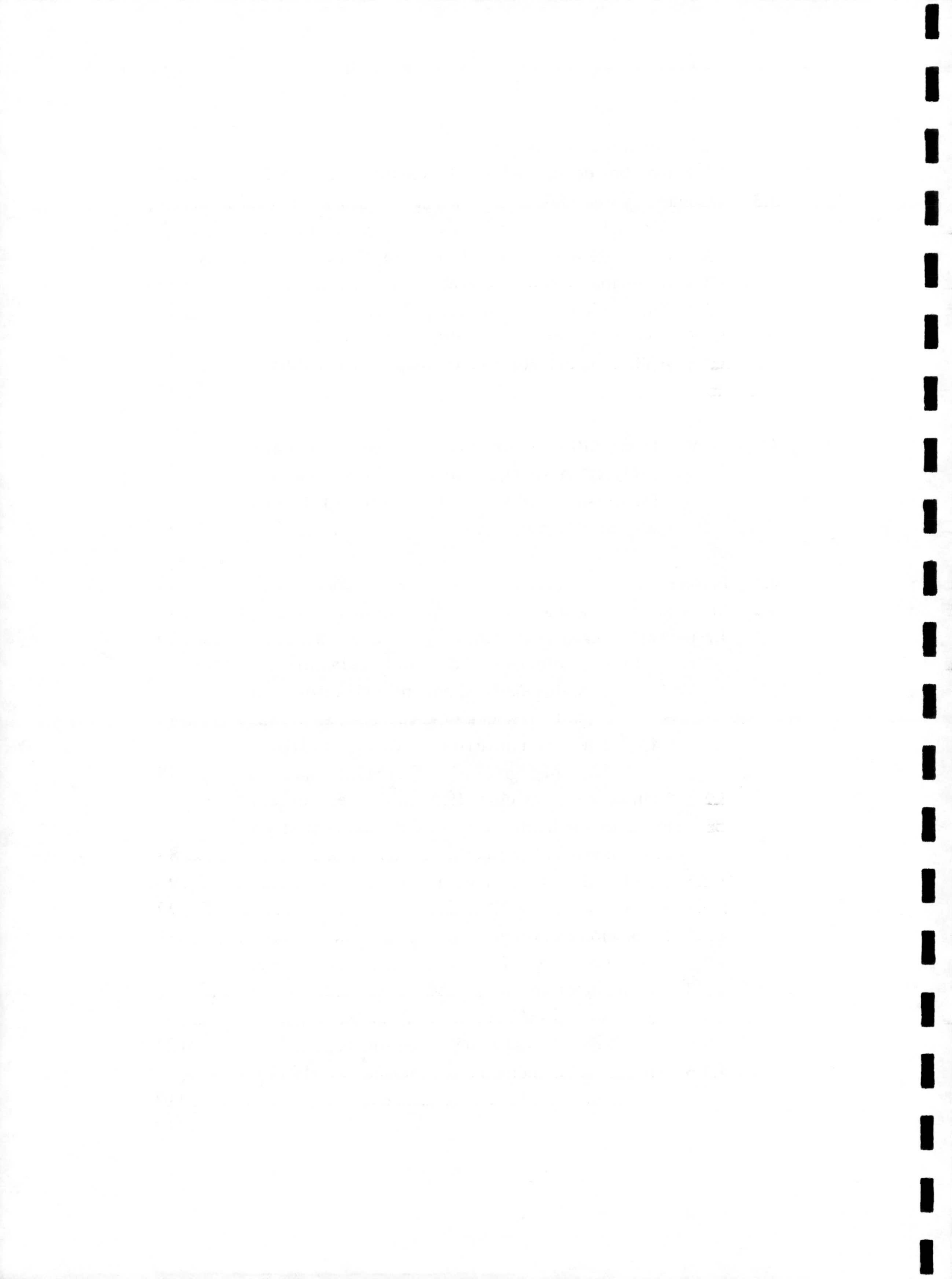


3.2.2	Método de extracción.....	53
3.2.3	Estudios de validación del método.....	54
3.3	Resultados y discusión.....	57
3.3.1	Separación cromatográfica.....	57
3.3.2	Confirmación del método cromatográfico.....	61
3.3.3	Selección de patron interno.....	65
3.3.4	Validación del método.....	66
3.3.5	Control de calidad en análisis de rutina.....	73
3.3.6	Aplicación del método a la campaña 1993/1994. .....	78

**CAPITULO IV Desarrollo de un Método Multirresiduos (MMRs) para el análisis de 13 plaguicidas Organoclorados (OCs) en matrices vegetales.....81**

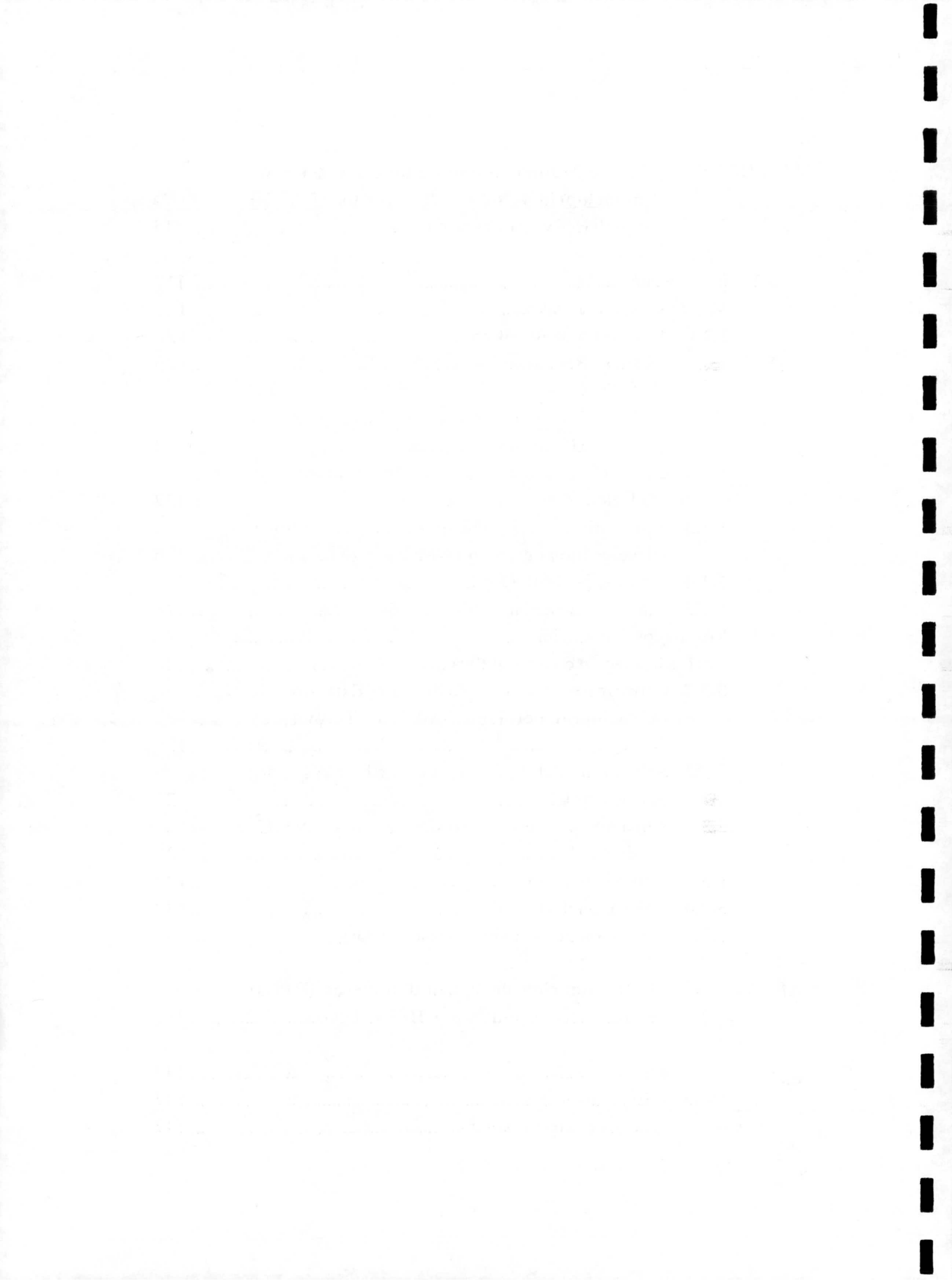
4.1	Introducción.....	83
4.2	Métodos Experimentales.....	86
4.2.1	Análisis cromatográfico.....	86
4.2.1.1	Aplicación de un método de optimización simultaneo a la resolución de 13 pesticidas OCs.....	86
4.2.1.2	Confirmación del método cromatográfico por GC-MS.....	88
4.2.2	Método de extracción. Estudio de clean-up del extracto mediante cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) de sílica.....	88
4.2.3	Estudios de validación del método.....	90
4.3	Resultados y discusión.....	92
4.3.1	Separación cromatografica.....	92
4.3.2	Confirmación por GC-MS.....	95
4.3.3	Estudio de clean-up.....	100
4.3.4	Validación del método.....	103
4.3.5	Control de calidad en análisis de rutina.....	108
4.3.6	Aplicación del método a la campaña 1993/1994. .....	110







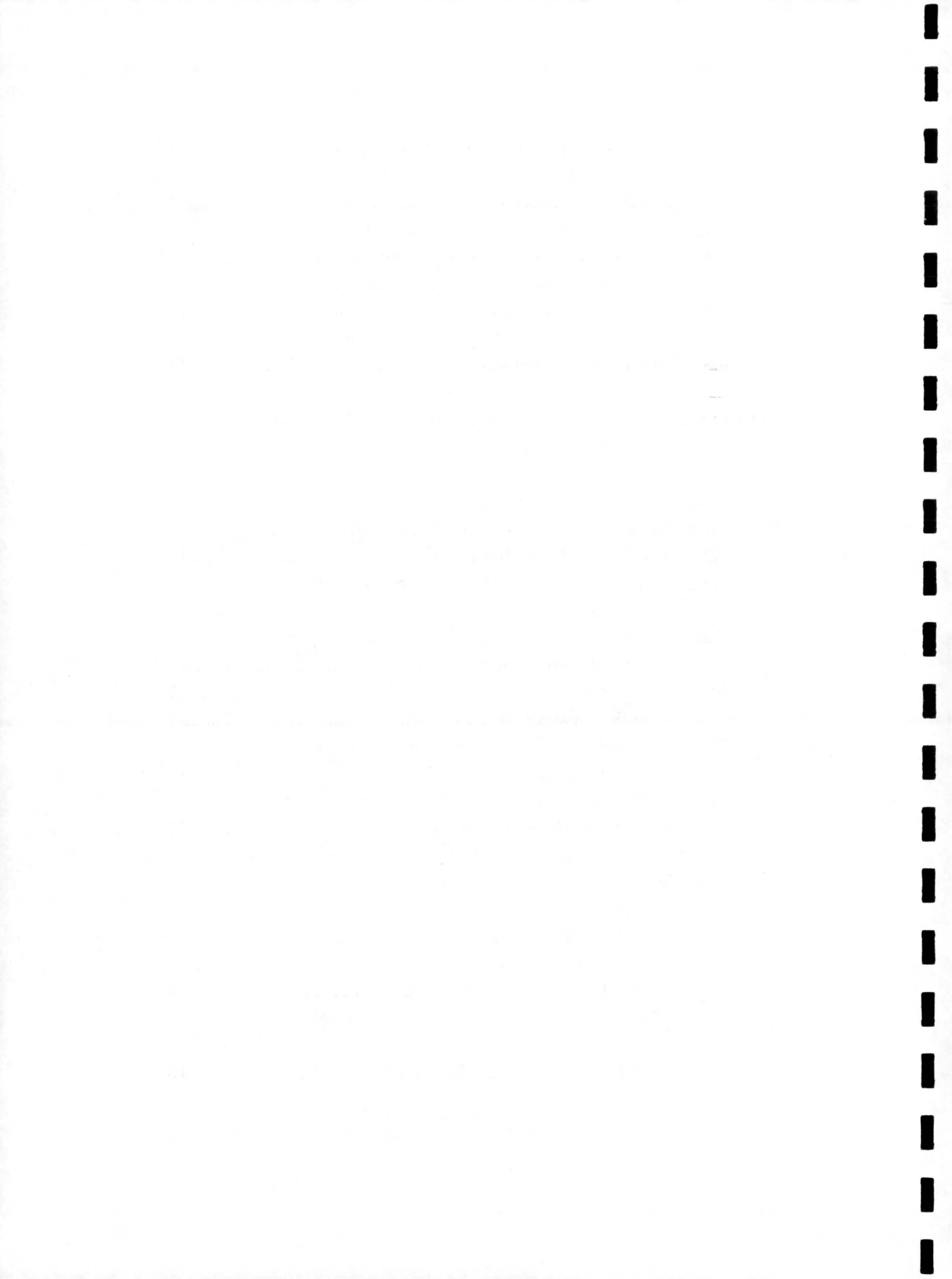
<b>CAPITULO V</b>	<b>Método Multirresiduos de determinación de Imidacloprid y N-Metilcarbamatos (NMCs) en matrices vegetales por HPLC.....</b>	<b>115</b>
5.1	Introducción.....	117
5.2	Métodos Experimentales.....	120
5.2.1	Análisis cromatográfico. ....	120
5.2.1.1	Separación y detección.....	120
5.2.1.2	Criterios de identificación. Identificación de Imidacloprid por HPLC-MS.....	122
5.2.2	Estudio de métodos de extracción de Imidacloprid en matrices vegetales. ....	122
5.2.3	Aplicación del método de extracción seleccionado al grupo de NMCs estudiados.....	126
5.2.4	Estudios de clean-up.....	126
5.2.5	Estudios de validación del método.....	128
5.3	Resultados y discusión.....	128
5.3.1	Separación cromatografica.....	128
5.3.2	Criterios de identificación. Estudio de Imidacloprid por HPLC-MS con Termospray (TSP).....	130
5.3.3	Selección del método de extracción para Imidacloprid.....	132
5.3.4	Aplicación del método a los NMCs seleccionados.....	134
5.3.5	Estudios de clean-up.....	134
5.3.6	Validación del método. ....	137
5.3.7	Aplicación del método a muestras reales.....	140
<b>CAPITULO VI</b>	<b>Determinación de Benzoilfenilureas (BPUs) en matrices vegetales por HPLC-DAD.....</b>	<b>143</b>
6.1	Introducción.....	145
6.2	Métodos Experimentales.....	147
6.2.1	Análisis cromatográfico. ....	147





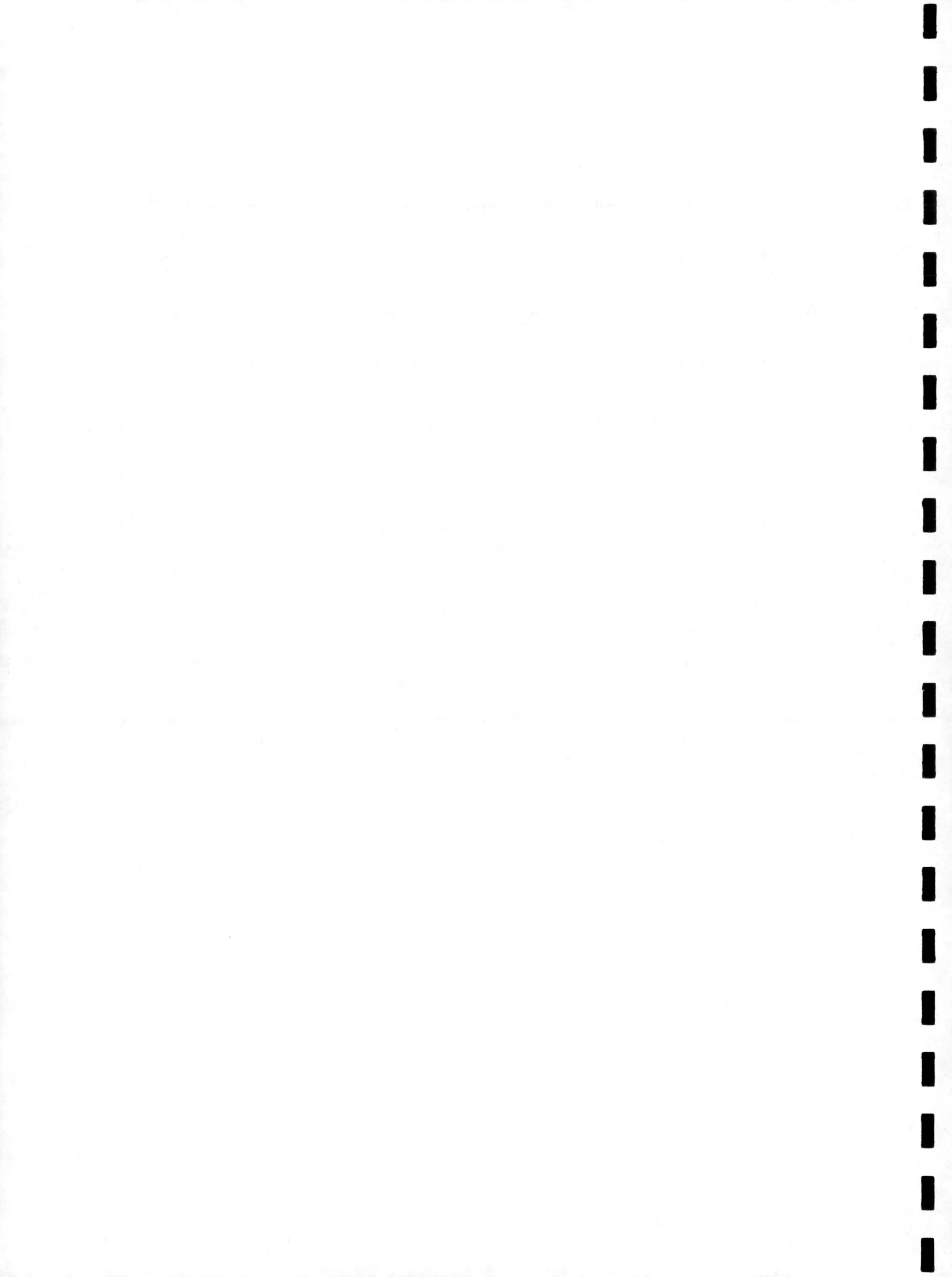
6.2.1.1	Separación y detección.....	147
6.2.1.2	Criterios de identificación.....	148
6.2.2	Método de extracción.....	149
6.2.3	Preconcentración y clean-up del extracto.....	149
6.2.4	Estudios de validación del método.....	151
6.3	Resultados y discusión.....	152
6.3.1	Separación cromatográfica e identificación.....	152
6.3.2	Método de extracción y preconcentración.....	154
6.3.3	Validación del método.....	157
<b>CAPITULO VII Estudio de métodos de identificación por GC-</b>		
<b>MS e Inmunoensayo.....</b>		
		<b>161</b>
7.1	Introducción.....	163
7.2	Identificación por GC-MS de compuestos OPs.....	164
7.2.1	Estudio y asignación de iones.....	165
7.2.2	Selección de iones para el análisis en modo SIM. .....	170
7.2.3	Aplicación del método en muestras vegetales. Cálculo del límite de detección.....	170
7.3	Identificación por GC-MS de compuestos OCs.....	176
7.3.1	Estudio y asignación de iones.....	177
7.3.2	Selección de iones para el análisis en modo SIM. .....	177
7.3.3	Aplicación del método en muestras vegetales. Cálculo del límite de detección.....	179
7.4	Aplicación de métodos de inmunoensayo para la identificación y cuantificación de procimidona en muestras vegetales.....	180
7.4.1	Métodos Experimentales.....	181
7.4.1.1	Método de extracción.....	181
7.4.1.2	Análisis pos Inmunoensayo.....	181
7.4.1.3	Criterios de Identificación y cuantificación.....	182
7.4.1.4	Estudios de validación del método.....	182
7.4.2	Resultados y Discusión.....	184
7.4.2.1	Confirmación cromatográfica.....	184





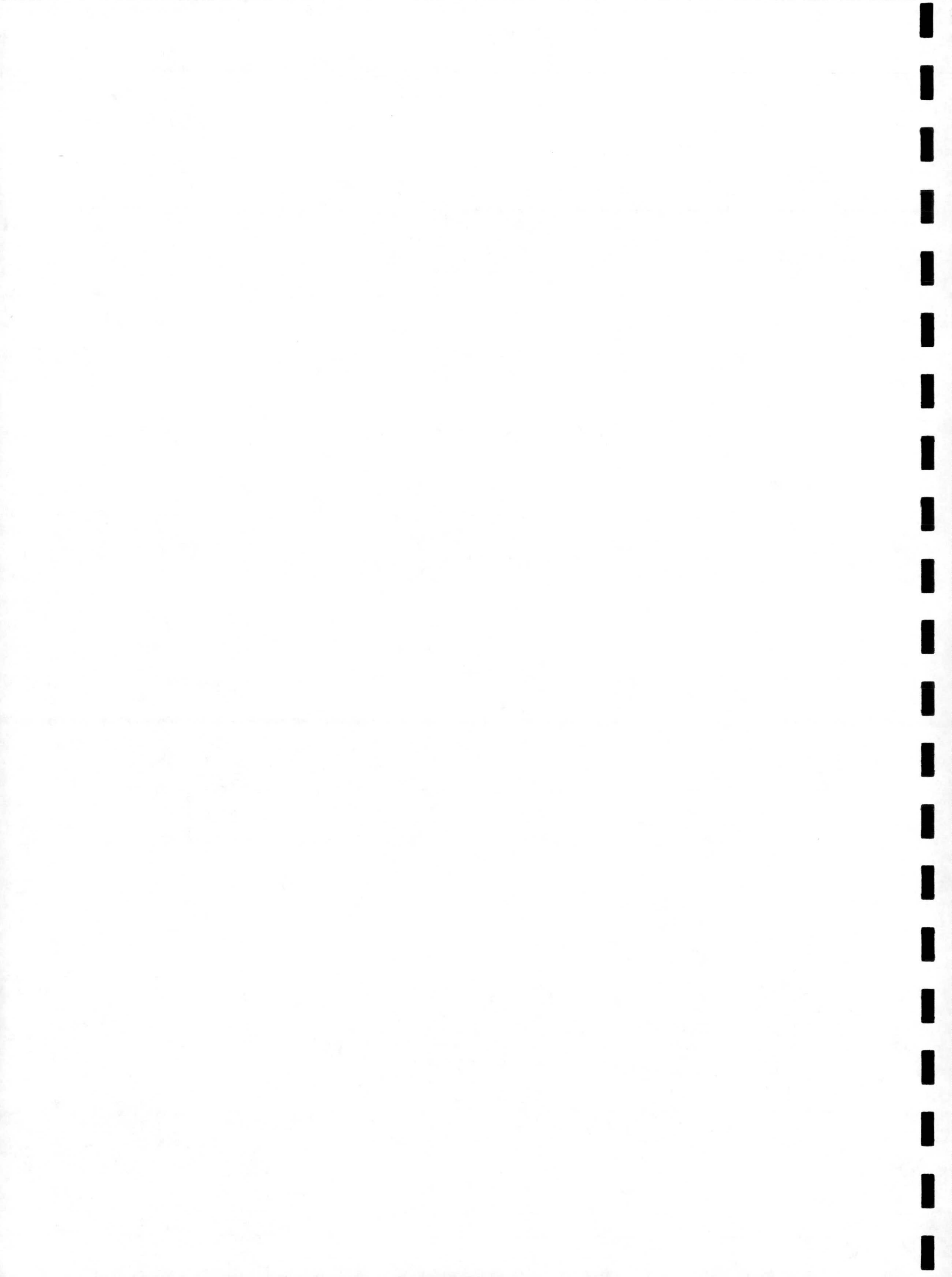
7.4.2.2 Validación del método.....	187
<b>CAPITULO VIII Conclusiones.....</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>195</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>203</b>
Anexo I LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países.....	205
Anexo II Abreviaturas utilizadas en el texto.....	213

-----





**OBJETIVOS**

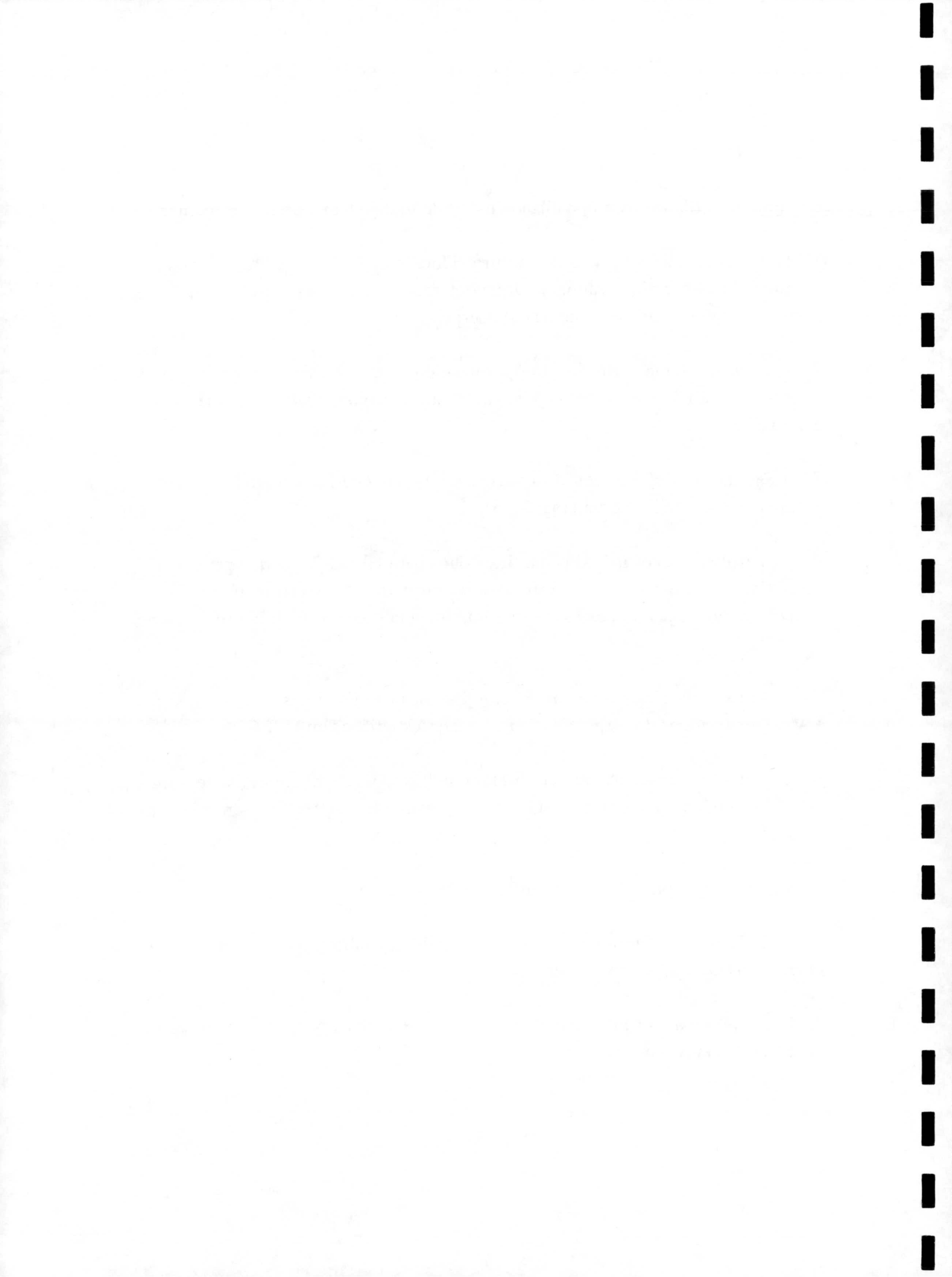




## OBJETIVOS

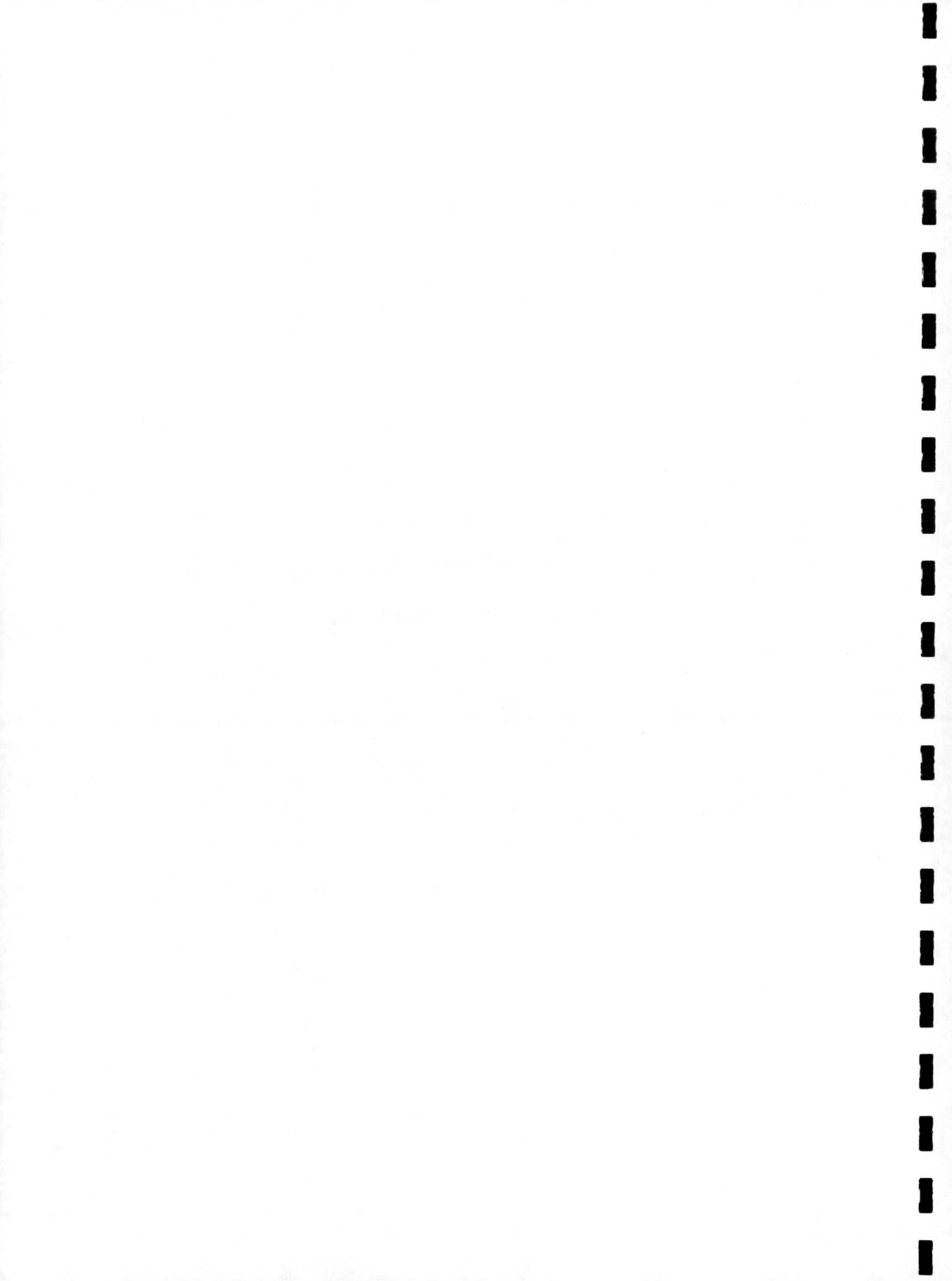
Los objetivos fijados para la realización de este trabajo han sido los siguientes:

- 1.- Desarrollar un único método multiresiduos para GC que incluya todos los plaguicidas Organofosforados y Organoclorados de interés en el análisis de frutas y hortalizas en la provincia de Almería.
- 2.- Aplicar diferentes criterios de optimización al método cromatográfico para conseguir análisis más rápidos y seguros que permitan realizar al menos 60 análisis/día.
- 3.- Realización de estudios de confirmación por GC-MS de los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico.
- 4.- Desarrollar nuevos métodos multiresiduos para HPLC-DAD que permitan el análisis de plaguicidas como Imidacloprid, N-Metilcarbamatos o Benzoilfenilureas, compuestos de gran importancia por su uso en la provincia de Almería.
- 5.- Desarrollar criterios de identificación basados en el análisis de los espectros UV de los residuos de plaguicidas en vegetales estudiados en HPLC.
- 6.- Desarrollar criterios de identificación basados en el análisis de iones seleccionados, en análisis por GC-MS, de plaguicidas OPs y OCs en muestras vegetales.
- 7.- Validación y aplicación de los métodos desarrollados.
- 8.- Aplicación de criterios de Control de Calidad analítico para el análisis de plaguicidas OPs y OCs en vegetales.
- 9.- Desarrollo y aplicación de nuevos métodos de análisis por Inmunoensayo de Procimidona en vegetales.



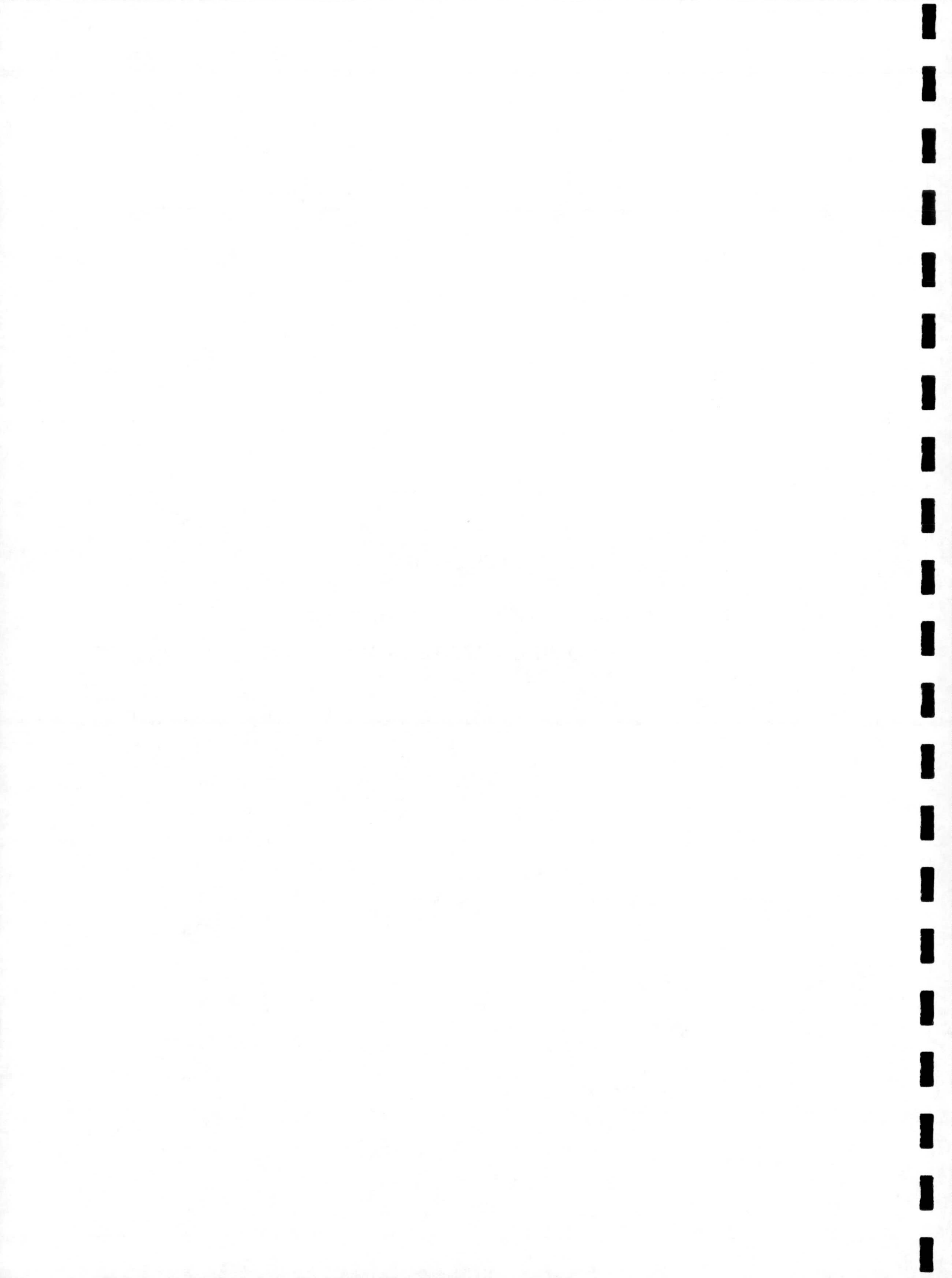


CAPITULO I  
INTRODUCCION GENERAL





**CAPITULO II**  
**REACTIVOS, MATERIALES, DISOLUCIONES**  
**Y EQUIPOS UTILIZADOS.**





## CAPITULO II

### REACTIVOS, MATERIALES, DISOLUCIONES Y EQUIPOS UTILIZADOS.

#### 2.1.- REACTIVOS

Los disolventes utilizados para el desarrollo de los métodos de extracción propuestos fueron en todos los casos de calidad "Para Análisis de Residuos (PAR)". Han sido suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) y por Panreac (Barcelona, España). Los disolventes utilizados fueron los siguientes: Acetato de etilo, acetona, éter de petróleo y diclorometano PAR suministrados por Merck; agua para HPLC de Merck; acetonitrilo y metanol para HPLC calidad gradiente de Merck; éter dietílico PA suministrado por Panreac.

Otros reactivos empleados fueron: trifenilfosfato (TPP), acetato amónico, hidróxido sódico y cloruro sódico, calidad para análisis de Merck; sulfato sódico anhidro (12-60 mesh) PAR de Merck.

Los patrones utilizados, así como el grado de pureza disponible y la casa suministradora, se recogen en la Tabla 2.1.

#### 2.2.- MATERIALES

Los materiales empleados en este trabajo fueron:

Minicolumnas de extracción en fase sólida de sílica gel de 500 mg/ 3 cc, suministradas por Whatman (Maidstone, Inglaterra).

Minicolumnas de extracción en fase sólida Sep-Pack Vac RC de C-18 de 100 mg y 55-105  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, suministradas por Millipore (Bedford, M.A., USA).

Minicolumnas de extracción en fase sólida ODS-6 de 500 mg/6 cc, suministradas por Whatman.



TABLA 2.1

*Plaguicidas estudiados en este trabajo, grado de pureza disponible y casa suministradora.*

Plaguicida	Riqueza (%)	Fab./Dist.
Acefato	95,0	Riedel de Haën
Captan	99,0	Riedel de Haën
Carbaril	99,0	Riedel de Haën
Carbofenotion	97,0	Riedel de Haën
Carbofurano	99,5	FMC Spain S.A.
3-Hidroxicarbofurano	98,2	FMC Spain S.A.
Cipermetrin	98,0	Riedel de Haën
Clorfenvinfos	98,0	Riedel de Haën
Clormefos	96,0	Riedel de Haën
Clorpirifos	99,0	Riedel de Haën
Clorpirifos metil	99,0	Riedel de Haën
Clortalonil	99,0	Chem Service
Demeton-S-metil	92,0	Riedel de Haën
Diclofluanida	99,0	Riedel de Haën
Diclorvos	99,0	Riedel de Haën
Dicofol	99,0	Riedel de Haën
Diflubenzuron	99,9	Dr. Ehrenstorfer
Dimetoato	99,0	Riedel de Haën
Endosulfan - $\alpha$	99,0	Riedel de Haën
Endosulfan - $\beta$	99,0	Riedel de Haën
Endosulfan sulfato	98,0	Riedel de Haën
Etrimfos	40,0	Riedel de Haën
Fenamifos	99,0	Riedel de Haën
Fenitrotion	99,0	Riedel de Haën
Fention	97,0	Riedel de Haën
Flufenoxuron	97,6	Shell
Folpet	99,0	Riedel de Haën



TABLA 2.1 (Cont.)

*Plaguicidas estudiados en este trabajo, grado de pureza disponible y casa suministradora.*

Plaguicida	Riqueza (%)	Fab./Dist.
Fosalone	99,0	Riedel de Haën
Hexaflumuron	99,0	DowElanco
Imidacloprid	99,9	Bayer
Lindano	99,0	Riedel de Haën
Malation	99,0	Riedel de Haën
Mecarban	98,0	Riedel de Haën
Metamidofos	98,0	Chem Service
Metidation	99,0	Riedel de Haën
Metiocarb	99,0	Riedel de Haën
Metiocarb sulfoxido	Disol	Dr. Ehrenstorfer
Metiocarb sulfona	99,9	Dr. Ehrenstorfer
Mevinfos	99,0	Riedel de Haën
Monocrotofos	99,0	Riedel de Haën
1- Naftol	Disol	Riedel de Haën
Naled	99,0	Riedel de Haën
Ometoato	98,0	Riedel de Haën
Paration metil	99,0	Riedel de Haën
Pirazofos	99,0	Riedel de Haën
Piridafention	Disol	Dr. Ehrenstorfer
Pirimifos metil	99,0	Riedel de Haën
Procimidona	99,0	Dr. Ehrenstorfer
Quinalfos	99,0	Riedel de Haën
Triflumuron	99,0	Bayer A.G.
Teflubenzuron	95,3	Dr. Ehrenstorfer
Tetradifon	99,0	Riedel de Haën
Triazofos	80,0	Riedel de Haën
Vinclozolina	99,0	Riedel de Haën



Filtros de membrana de disco de 0.45  $\mu\text{m}$  para filtración de disolventes de HPLC, suministrados por Whatman.

Filtros de jeringa para filtración de muestras para HPLC de PVDF 0.20  $\mu\text{m}$ , suministrados por Whatman.

Jeringas Hamilton de 10  $\mu\text{L}$  para su uso en cromatografía de gases y de 25  $\mu\text{L}$  para HPLC.

Kit comercial para análisis de Procimidona EnviroGard™ EIA suministrado por Millipore.

## 2.3.- DISOLUCIONES EMPLEADAS.

### 2.3.1.- Análisis de pesticidas organofosforados (OPs).

*Soluciones patrón de alta concentración.* Se prepararon disolviendo 10.0-15.0 mg de cada patrón de pureza certificada en 100 mL de éter de petróleo con un 10% de acetona. Se obtuvieron así disoluciones de 100.0-150.0 mg/L que eran almacenadas en frascos de vidrio ámbar y en frigorífico a 7°C.

*Disolución mezcla de patrones de trabajo.* Se preparó transfiriendo 1 mL de cada disolución patrón de alta concentración a un matraz de 100 mL y enrasando con éter de petróleo. La concentración de los pesticidas en esta disolución era de 1.0-1.5 mg/L. La estabilidad de esta disolución se controlaba diariamente mediante cartas de control. Se almacenaba en frigorífico a 7°C.

*Disolución de contaminación.* Contenía la mezcla de pesticidas estudiados a concentraciones entre 4.0-6.0 mg/L, en éter de petróleo. Alícuotas de 2.5 y 0.5 mL de esta disolución se utilizaron para las pruebas de recuperación realizadas.

*Disoluciones de patrones internos.* Los pesticidas estudiados para su uso como patrón interno fueron: Clormefos, Fention, Demeton-S-Metil y Trifenilfosfato (TPP). Se preparó una disolución mezcla de todos ellos, en éter de petróleo, de concentración entre 0.6 y 1.0 mg/L, para las pruebas de identificación y recuperación.



### 2.3.2.- Análisis de pesticidas organoclorados (OCs).

*Soluciones patrón de alta concentración.* Las soluciones concentradas de pesticidas se prepararon disolviendo 10.0-15.0 mg de cada patrón de pureza certificada en 100 mL de éter de petróleo, para obtener soluciones de 100.0-150.0 mg/L que eran almacenadas en frascos de vidrio ámbar y en frigorífico a 7°C.

*Disolución mezcla de patrones de trabajo.* Se preparó transfiriendo 1 mL de cada disolución patrón de alta concentración a un matraz de 100 mL y enrasando con éter de petróleo. La concentración de los pesticidas en esta disolución era de 1.0-1.5 mg/L. La estabilidad de esta disolución se controlaba diariamente mediante cartas de control. Se almacenaba en frigorífico a 7°C.

*Disolución de contaminación.* Contenía la mezcla de pesticidas estudiados a concentraciones entre 3.0-5.0 mg/L, en éter de petróleo. Alícuotas de 2.5 y 0.5 mL de esta disolución se utilizaron para las pruebas de recuperación realizadas.

*Solución de elución para el clean-up.* Consistió en una mezcla de éter dietílico:éter de petróleo (1:1).

### 2.3.3.- Análisis Imidacloprid y N-Metilcarbamatos (NMCs) por HPLC.

*Soluciones patrón de alta concentración.* Se prepararon disolviendo 10.0-15.0 mg de cada patrón de pureza certificada en 100 mL acetonitrilo, para obtener soluciones de 100.0-150.0 mg/L que eran almacenadas en frascos de vidrio ámbar y en frigorífico a 7°C.

*Disolución de contaminación multipatrón.* Contenía la mezcla de pesticidas estudiados a concentraciones entre 10.0-12.0 mg/L, en acetonitrilo. Alícuotas de 1.0 y 0.2 mL de esta disolución se utilizaron para las pruebas de recuperación realizadas.

*Disolución mezcla de patrones de trabajo.* Se preparó a partir de la disolución de contaminación multipatrón, tomando 1 mL de ésta y llevando a un volumen final de 5 mL en acetonitrilo:agua (1:3). La concentración de los pesticidas en



esta disolución era de 2.0-2.4 mg/L. Esta solución se preparaba diariamente para evitar posibles descomposiciones de pesticidas por la presencia de agua.

*Disolución de contaminación de Imidacloprid.* Contenía 10 mg/L de este pesticida en acetonitrilo. Alícuotas de 1 mL de esta disolución fueron utilizadas en las pruebas de recuperación realizadas.

*Disolución de trabajo de Imidacloprid.* Se preparó a partir de la disolución de contaminación de Imidacloprid, tomando 1 mL de ésta y llevando a un volumen final de 5 mL en acetonitrilo:agua (1:3). La concentración de Imidacloprid en esta disolución era de 2.0 mg/L. Esta solución se preparaba diariamente para evitar posibles descomposiciones del pesticida por la presencia de agua.

*Disolución tampón (2 mol/L) de  $KH_2PO_4/NaOH$ :* Disolver 121 g de  $KH_2PO_4$  en 500 mL de agua desionizada y destilada y ajustar el pH a 7.2 con disolución de NaOH 1 mol/L. Diluir hasta 1 L. Añadir cloruro sódico a la solución hasta conseguir la saturación mientras se agita continuamente.

#### **2.3.4.- Análisis de Benzoilfenilureas.**

*Soluciones patrón de alta concentración.* Se prepararon disolviendo 10.0-15.0 mg de cada patrón de pureza certificada en 100 mL acetonitrilo, para obtener soluciones de 100.0-150.0 mg/L que eran almacenadas en frascos de vidrio ámbar y en frigorífico a 7°C.

*Disolución de contaminación.* Contenía la mezcla de patrones de interés en concentraciones entre 3.0-3.3 mg/L en acetonitrilo. Para las pruebas de fortificación se utilizaron alícuotas de 1.0 y 0.3 mL.

*Disolución mezcla de patrones de trabajo.* Se preparó a partir de la disolución de contaminación, tomando 1.3 mL de ésta y llevando a un volumen final de 4 mL en acetonitrilo:agua (1:1). La concentración de los pesticidas en esta disolución era de 0.9-1.0 mg/L. Esta solución se preparaba diariamente para evitar posibles descomposiciones de pesticidas por la presencia de agua.



### 2.3.5.- Análisis de Procimidona por Inmunoensayo.

*Solucion patrón de alta concentración.* Se preparó disolviendo 10.0 mg del patrón de Procimidona de pureza certificada en 100 mL de éter de petróleo, con lo que se obtenía una disolución de 100.0 mg/L que era almacenada en frasco de vidrio ámbar y en frigorífico a 7°C.

*Disolución patrón de trabajo.* Se preparó transfiriendo 0.2 mL de la disolución patrón de 100 ppm a un matraz aforado de 100 mL y enrasando con éter de petróleo. La disolución así preparada contenía 0.2 mg/L de Procimidona.

*Disoluciones patrón de calibración.* Se prepararon a partir de la disolución patrón de trabajo añadiendo alícuotas de 30, 50, 100, 200, 300, 800, 1000 y 2000 µL de esta disolución a viales que contenían 2 mL de extracto de muestras de pimienta en éter etílico:éter de petróleo (1:1). Cada una de estas disoluciones era llevada a sequedad con corriente de nitrógeno y recompuesta con 2 mL de agua. Se obtenían así soluciones patrón en extracto de pimienta en un rango de concentración entre 3-200 µg/L.

## 2.4.- INSTRUMENTACION.

Se contó con tres equipos de cromatografía de gases (GC) con diferentes detectores, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), un sistema GC-MS, un sistema HPLC-MS y un espectrofotómetro ultravioleta/visible (SP-UV/VIS). Las características de los equipos, detectores y columnas utilizadas, así como las condiciones de funcionamiento, se describen a continuación.

**GC-FPD.** Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer (Beaconsfield, UK) modelo 8600 equipado con un detector fotométrico de llama (FPD). A él se conectó una columna capilar de sílice fundida SPB 1701 (30 m x 0.53 mm I.D. x 0.5 µm), enlazada con cianopropilfenilmetilsiloxano (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 10 mL/min. Las temperaturas de inyector y detector se fijaron en 250°C y 300°C respectivamente. Las condiciones usadas para el GC fueron optimizadas. El volumen de inyección fue de 3 µL.



**GC-ECD.** Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 5890 equipado con un detector de captura de electrones  $^{63}\text{Ni}$  (ECD). A él se conectó una columna capilar de sílice fundida HP1 (30 m x 0.53 mm D.I. x 2.65  $\mu\text{m}$ ) enlazada con metil-silicona. Se utilizó nitrógeno como gas portador a un flujo de 8 mL/min. Las temperaturas de inyector y detector se fijaron en 240°C y 300°C respectivamente. Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas. Volumen de inyección 1  $\mu\text{L}$ .

**GC-NPD.** Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 equipado con un detector de nitrógeno-fósforo con elemento activo de Rb (NPD). A él se conectó una columna capilar de sílice fundida HP-1 (30 m x 0.53 mm D.I. x 2.65  $\mu\text{m}$ ) enlazada con metil-silicona. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 20 mL/min. Las temperaturas de inyector y detector se fijaron en 250°C y 300°C respectivamente. Se utilizó un ciclo de temperatura programada que parte de una temperatura inicial de 150°C (1 min.), sube en una primera rampa (30°C/min.) hasta 190°C, en una segunda rampa (5°C/min.) hasta 220°C alcanzando una temperatura final de 260°C en una tercera rampa de 20°C/min. Volumen de inyección 1  $\mu\text{L}$ .

**GC-MS.** Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Serie II con un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo y sistema de ionización por impacto electrónico (IE). Se contó con un sistema de tratamiento de datos modelo HP Chemstation Serie II. La columna y condiciones cromatográficas fueron las descritas para GC-ECD y GC-FPD, en cada caso. La muestra se introdujo directamente en la fuente iónica. Se utilizó helio como gas portador. El espectro se obtuvo a 70 eV.

Para el trabajo realizado en el Capítulo VII se utilizó una columna capilar HP-5 (25 m x 0.20 mm D.I. x 0.33  $\mu\text{m}$ ). Se trabajó en split less. Se utilizó un ciclo de temperatura programada que parte de una temperatura inicial de 55°C (1 min.), sube en una primera rampa (40°C/min.) hasta 140°C (1 min), y en una segunda rampa (5°C/min.) hasta 260°C durante 15 min. La temperatura de inyector y detector fue de 280°C. Se utilizó He como gas portador. Volumen de inyección 1  $\mu\text{L}$ .

**HPLC-DAD.** Equipo de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemania) formado por una bomba modelo 1050, sistema de inyección Rheodine con válvula de seis

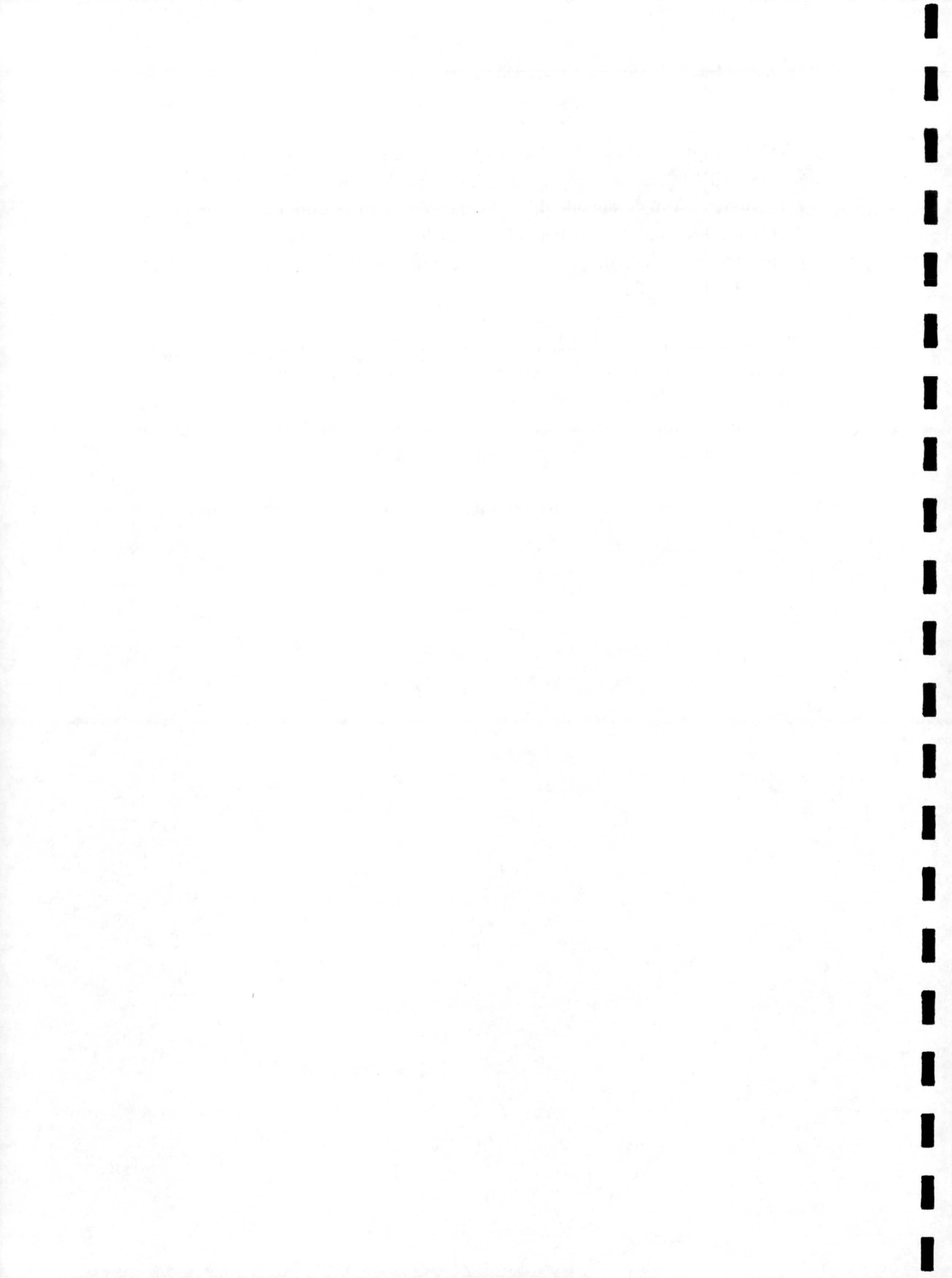


posiciones y loop de 20  $\mu$ L y detector ultravioleta 1040 de fotodiodos en linea e impresora HP/500. Se utilizó para el análisis una columna LiChrospher C-18 de 4 x 125 mm y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula (Merck). Las condiciones de la fase móvil serán descritas más adelante. La adquisición y proceso de datos se realizó con un ordenador HP equipado con el programa HPLC<sup>3D</sup> Chemstation (Serie Dos) de Hewlett-Packard.

**HPLC-MS.** Se contó con un equipo de Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) modelo 5988A provisto de espectrómetro de masas tipo cuadrupolo y una interfase de termonebulización ("thermospray"). La adquisición y proceso de datos se realizó con un equipo Hewlett-Packard modelo 35741B. La ionización se llevó a cabo por adición de acetato amónico a la fase móvil.

**SP-UV/VIS.** Espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Shimadzu Corporation Kyoto, Japon).



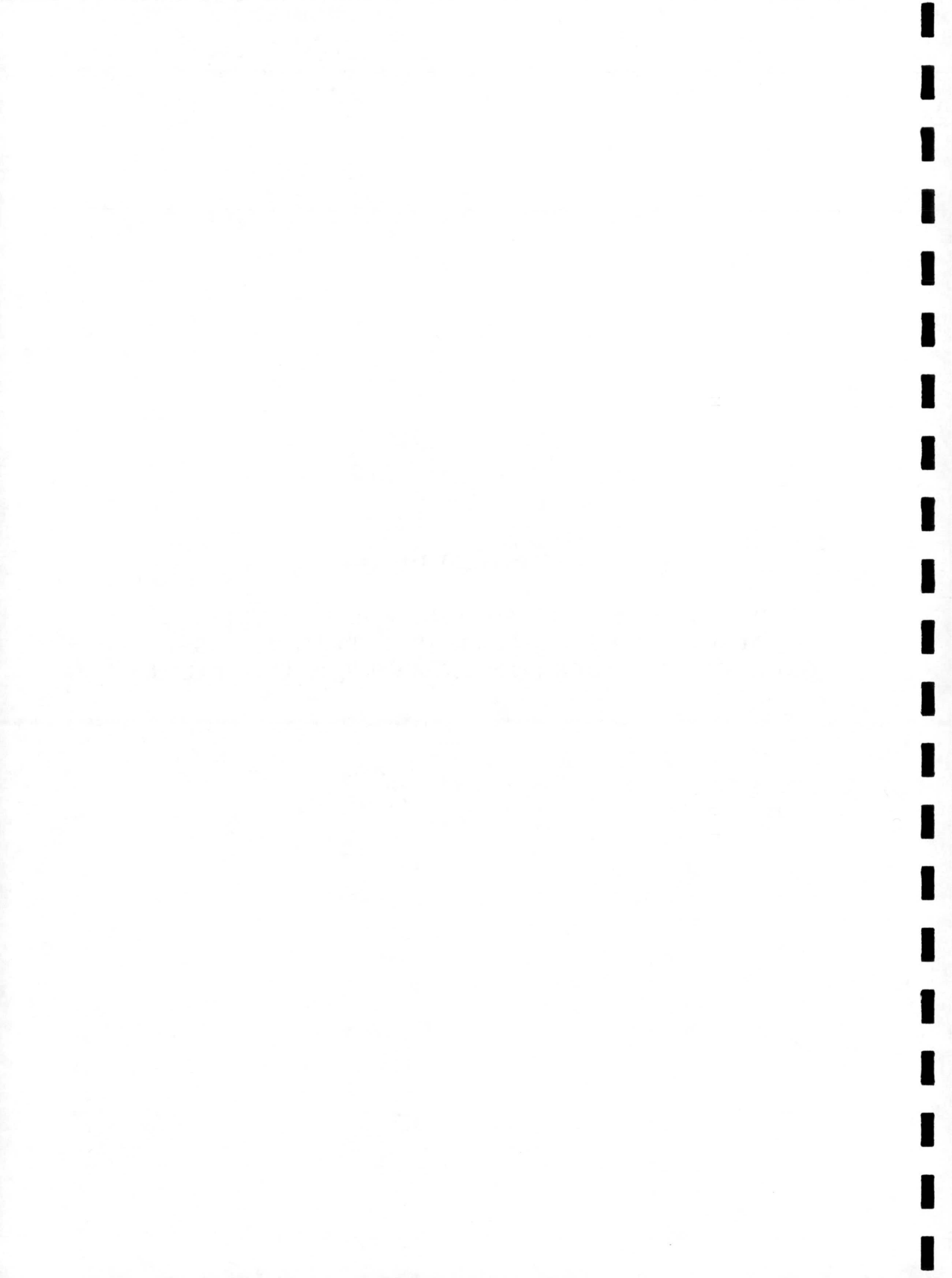




### **CAPITULO III**

**DESARROLLO DE UN METODO MULTIRRESIDUOS  
(MMRs) PARA EL ANALISIS DE 25 PLAGUICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS (OPs) EN MATRICES VEGETALES.**







## CAPITULO III

### DESARROLLO DE UN METODO MULTIRRESIDUOS (MMRs) PARA EL ANALISIS DE 25 PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS (OPs) EN MATRICES VEGETALES.

#### 3.1.- INTRODUCCION.

Los pesticidas OPs son un grupo de compuestos ampliamente utilizados en los cultivos hortícolas del sureste español en los últimos años. De ahí que sea imprescindible controlar el nivel de estos compuestos en la producción, no solo de cara al consumo sino también a la comercialización. Como ejemplo de la importancia de los residuos de OPs en nuestra producción, podemos citar que en el programa de vigilancia llevado a cabo por los laboratorios de control suecos sobre frutas y hortalizas exportadas por España en 1990-91, un 35% contenían residuos de pesticidas y un 4,5% superaban el límite máximo establecido. De entre los pesticidas responsables de estas violaciones fue el Metamidofos el más encontrado, junto con otros OPs como Clorpirifos, Ometoato, Pirimifos metil y Acefato.

El modo de acción de los insecticidas OPs consiste en la inhibición de la acción de muchas enzimas, pero la principal actividad en organismos vivos es contra la enzima acetilcolinesterasa. Esta controla la hidrólisis de la acetilcolina, generada en las uniones nerviosas, a colina. En ausencia de la acetilcolinesterasa, la acetilcolina liberada se acumula e impide la normal transmisión de los impulsos nerviosos. Esto causa pérdida de la coordinación muscular, convulsiones y finalmente la muerte. La acetilcolinesterasa es un componente esencial del sistema nervioso tanto en mamíferos como en insectos por lo que el mecanismo de acción tóxico es esencialmente el mismo en ambos.

Una característica importante de este grupo de compuestos es que sus miembros poseen propiedades físico-químicas muy diferentes, como distintas presiones de vapor a temperatura ambiente (0.00147 mPa para Piridafention, 2.1 Pa para Diclorvos) , diferentes solubilidades en agua (>2kg/L para Metamidofos, 1.4 mg/L para Clorpirifos). Esto hace que la selección del insecticida con respecto a su eficiencia, duración de acción, toxicidad, rango de actividad y



comportamiento en la planta sea muy amplio, lo que supone una ventaja de cara a su uso. Estas y otras características han hecho que los pesticidas OPs sean los más usados, desbancando, en la mayoría de los casos a los OCs, en desuso debido a su acumulación en el medio ambiente y su persistencia en el organismo. Sin embargo en lo que se refiere a su análisis estas diferentes características originan comportamientos cromatográficos muy diferentes. Si además consideramos que el número de compuestos a analizar es elevado y las restricciones en cuanto a tiempo total del análisis son importantes de cara al análisis en rutina, se hace necesaria una optimización adecuada de las condiciones cromatográficas.

La característica de alta polaridad de algunos de éstos compuestos OPs como Metamidofos, Acefato, Diclorvos, etc., también ha dado lugar a problemas en cuanto a su recuperación por los métodos habituales de análisis como el de Mills (37) o Luke (41,50). Esto ha obligado a desarrollar nuevos métodos de extracción que utilicen otros disolventes, entre los que destaca el acetato de etilo (43).

Otro aspecto importante a tener en cuenta con estos compuestos es la tendencia de algunos de ellos como Dimetoato, Ometoato, Naled, Acefato, Triclorfon a sufrir procesos de degradación (49), que si bien no son completamente conocidos, son consecuencia de descomposiciones térmicas, reacciones químicas con la fase estacionaria o reacciones con la matriz. Este hecho hace que, frecuentemente, los picos cromatográficos obtenidos en el análisis sean debidos a los productos de degradación y no a los pesticidas originales por lo que es de gran interés su confirmación por masas.

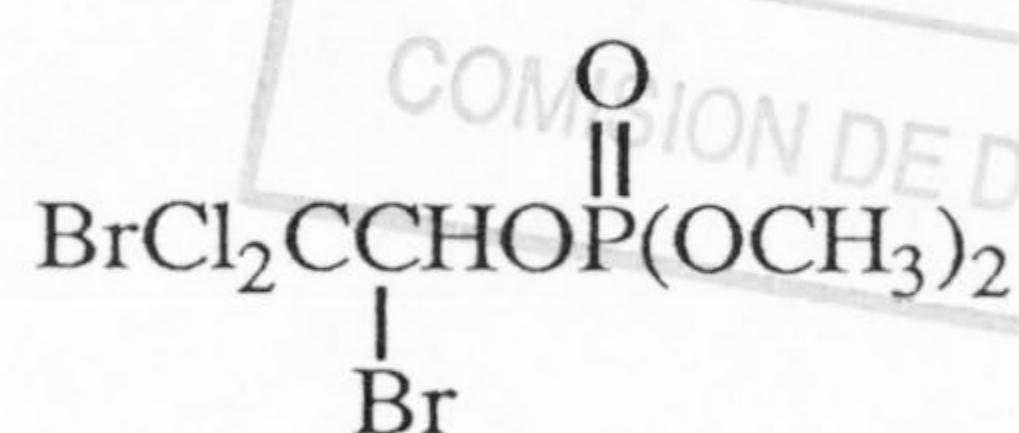
*OPs estudiados en este trabajo.* Se ha seleccionado para este estudio un grupo de 25 OPs que son o han sido usados habitualmente en los cultivos hortícolas bajo plástico del sureste español en los últimos años. Estos compuestos se pueden clasificar en grupos con estructura similar. Las estructuras de estos compuestos son las que se citan a continuación (Fig. 3.1).



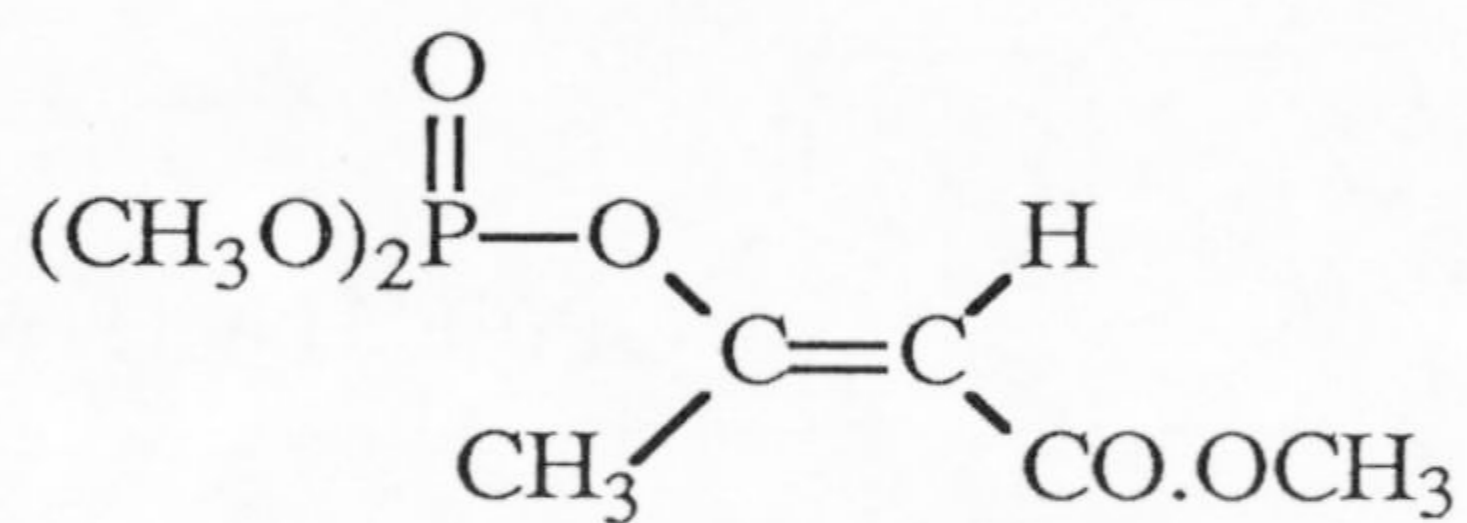
O,O Dimetil/dietil O-Fosfatos



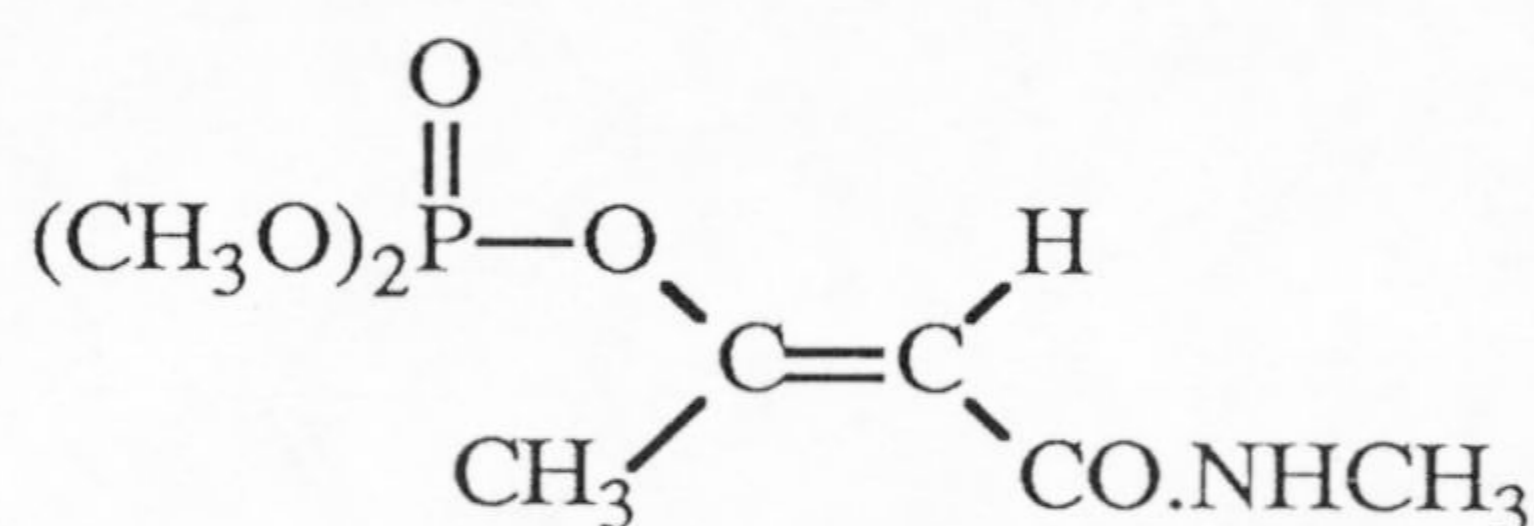
Diclorvos



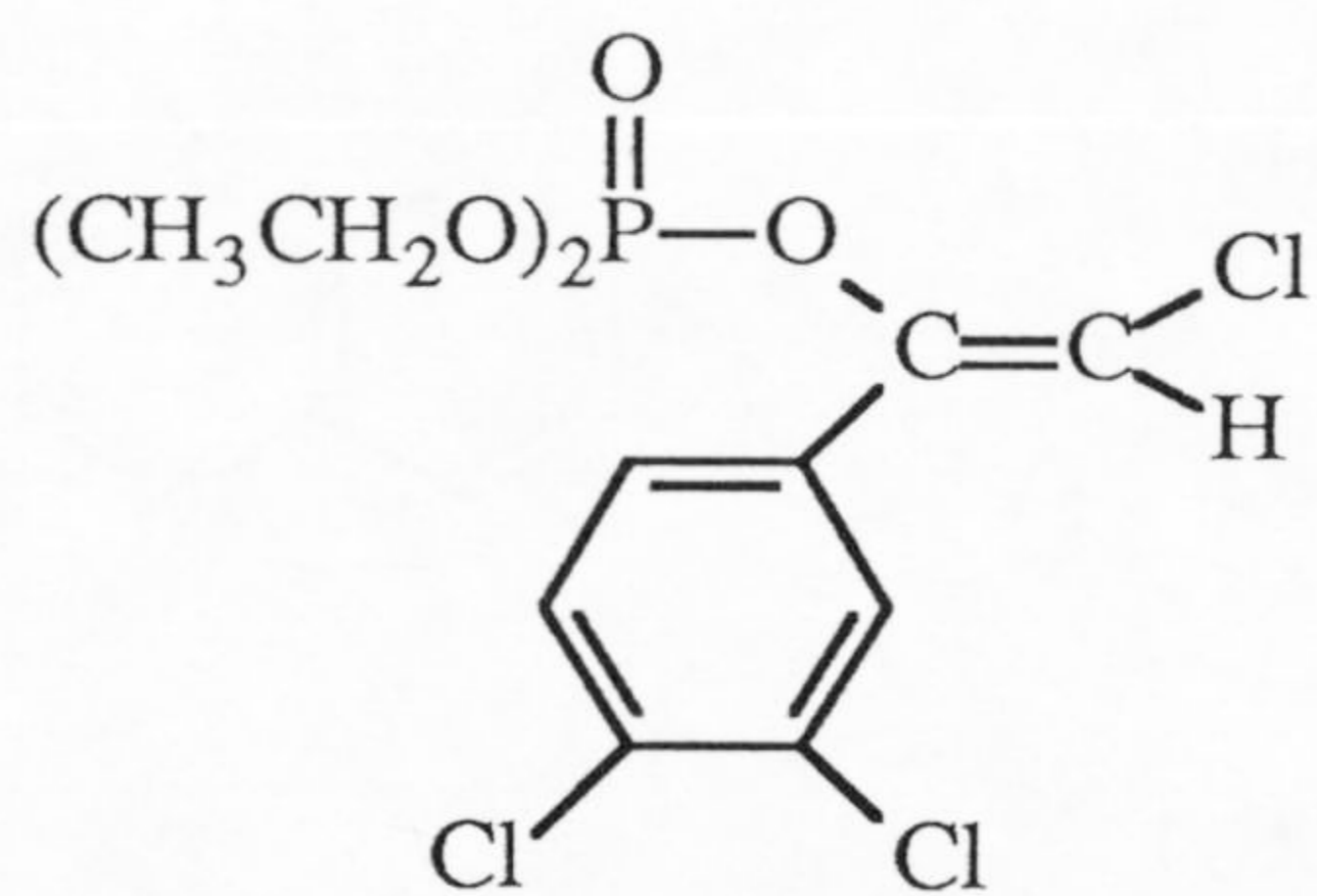
Naled



Mevinfos

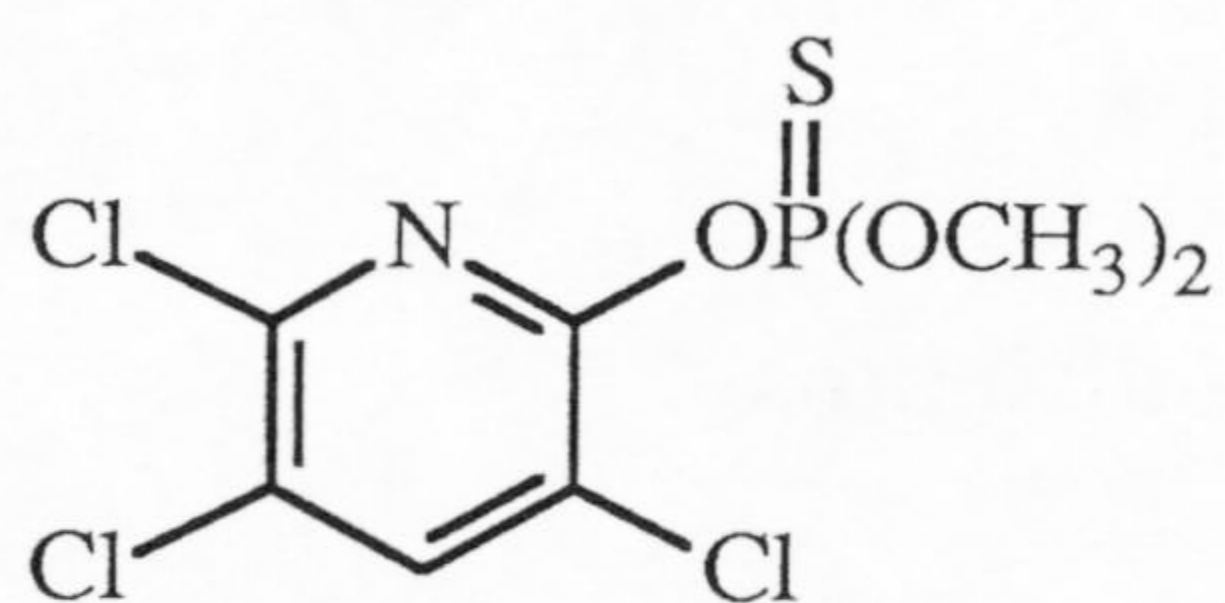


Monocrotofos

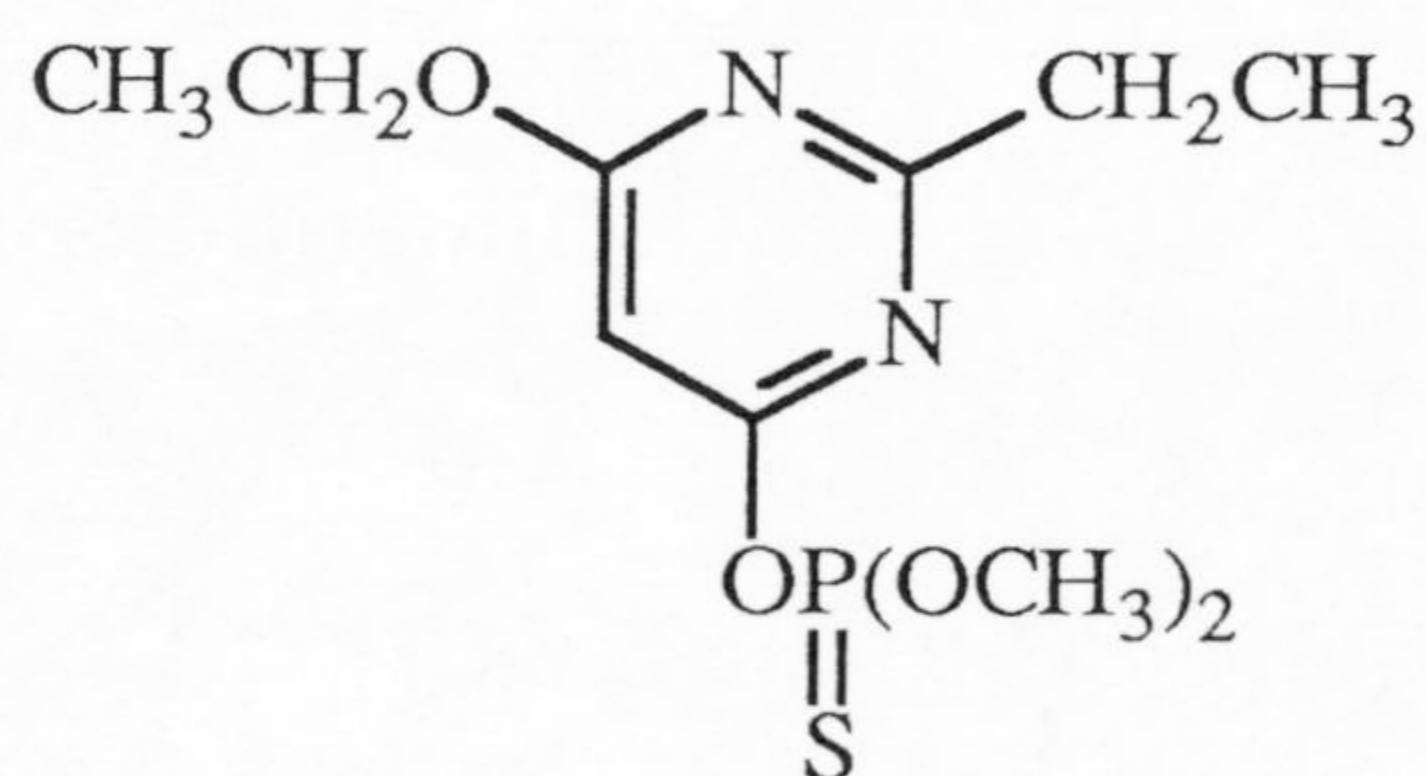


Clorfenvinfos

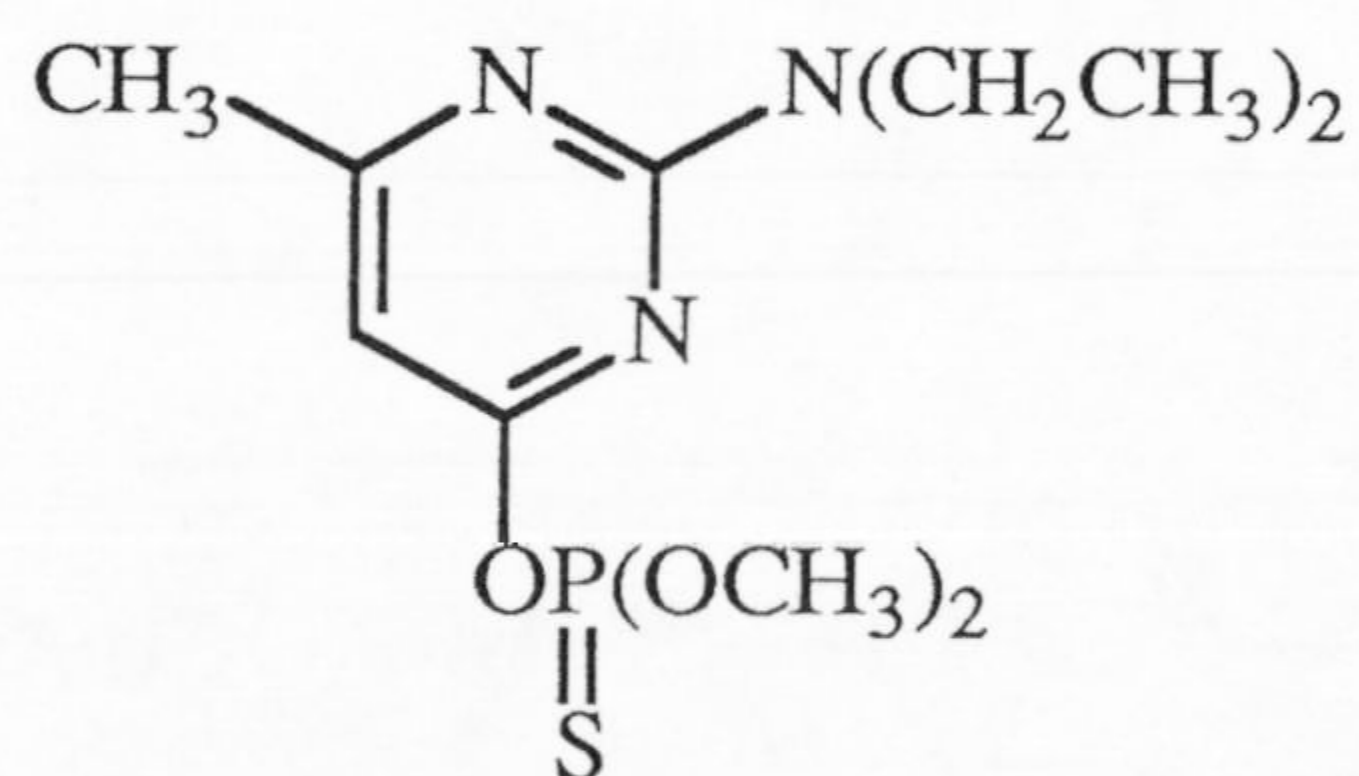
O,O Dimetil/dietil O-Fosforotioatos



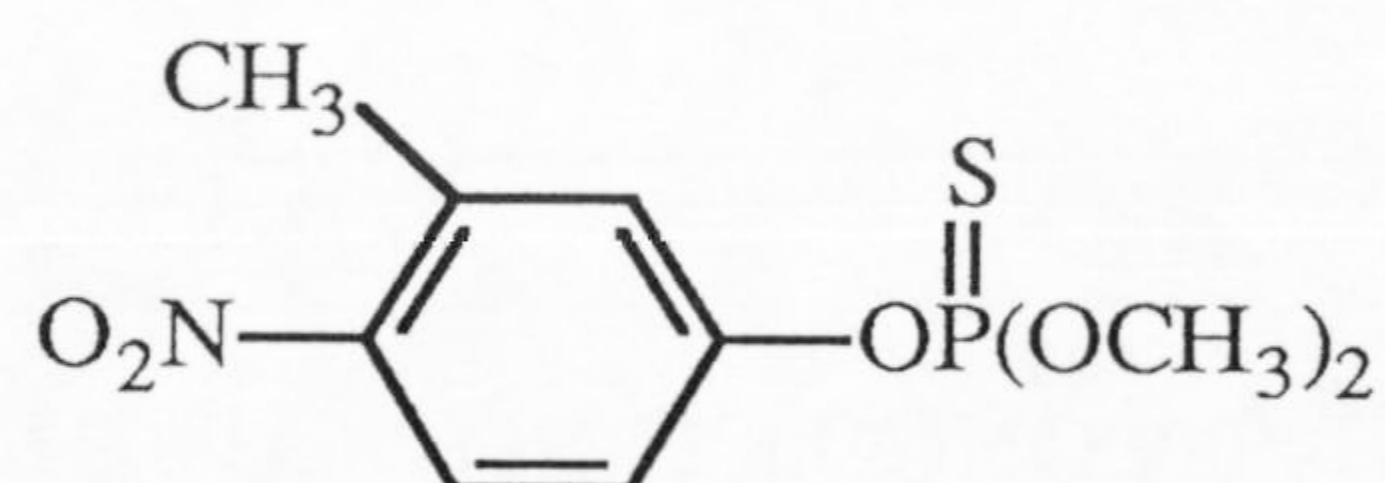
Clorpirifos metil



Etrimfos



Pirimifos metil



Fenitrotion

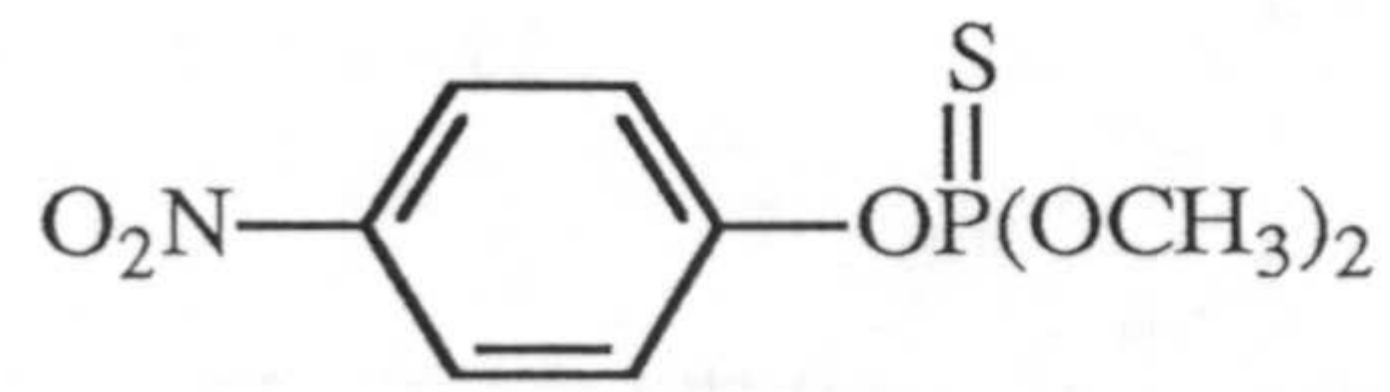
Figura 3.1.-Estructuras de los pesticidas OPs estudiados.



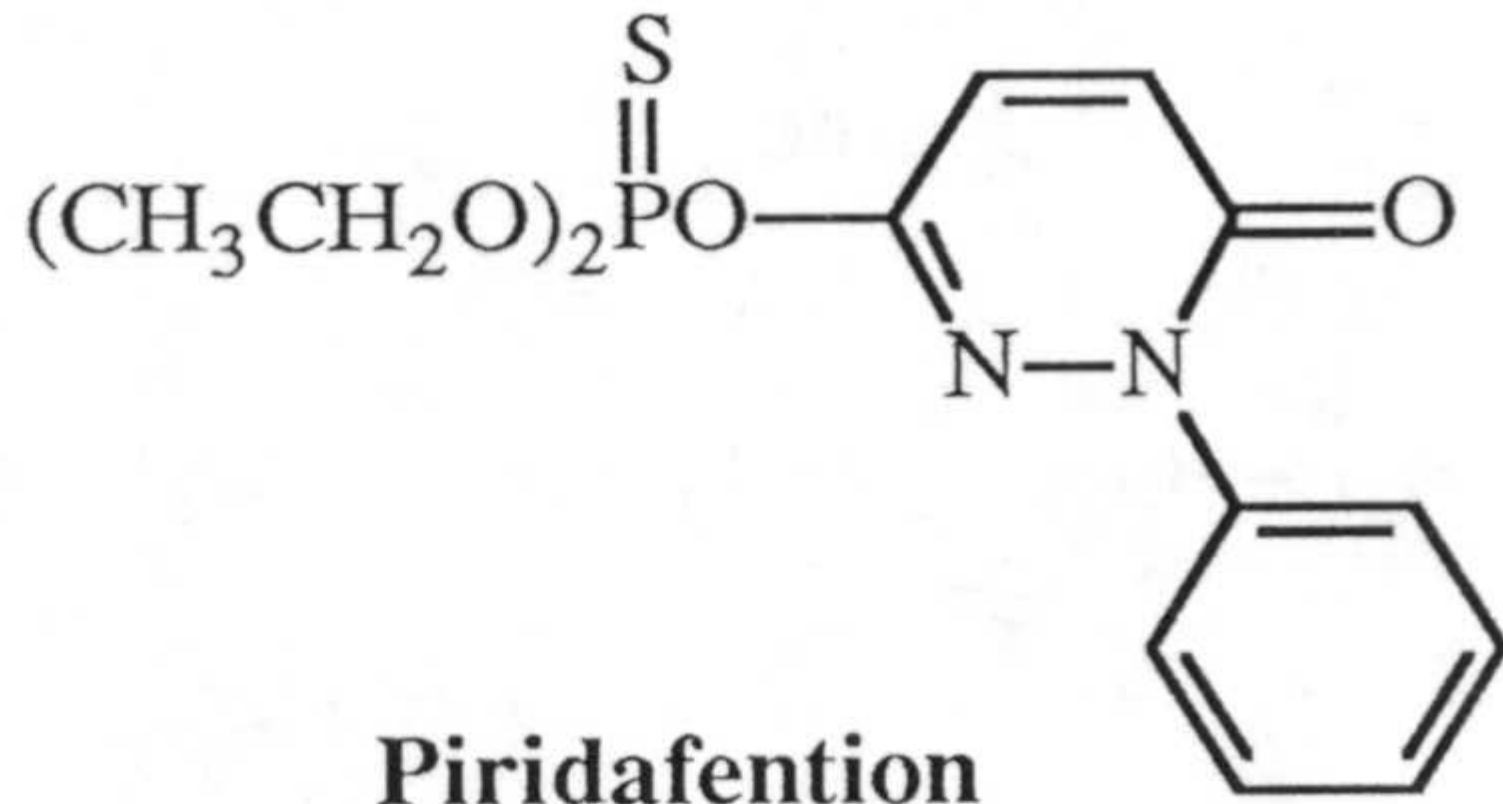




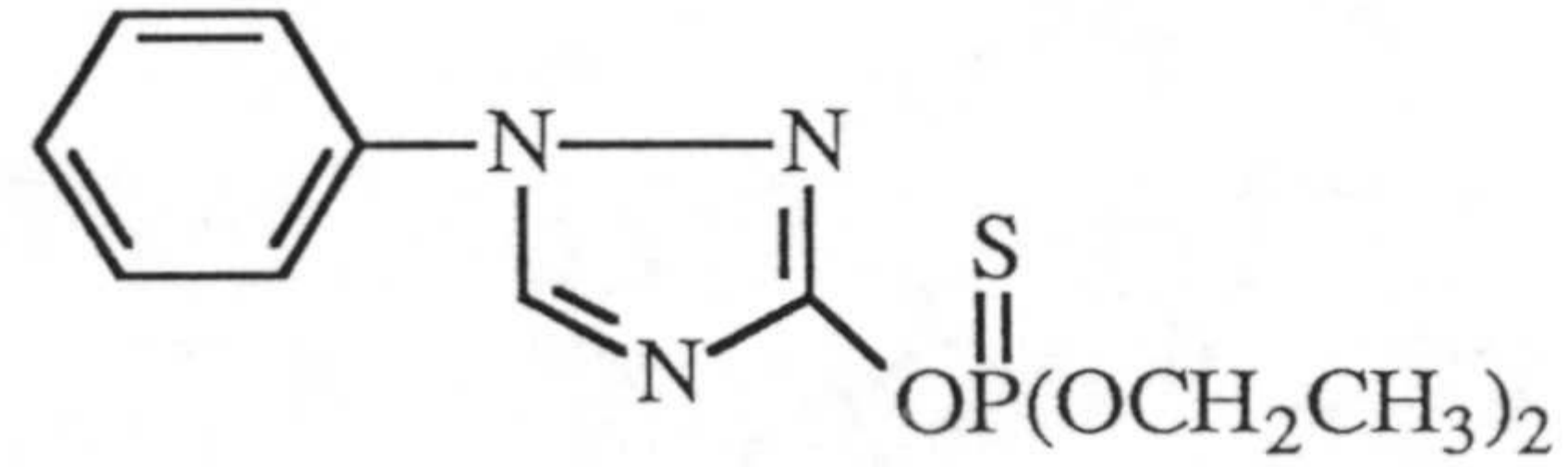
**Ometoato**



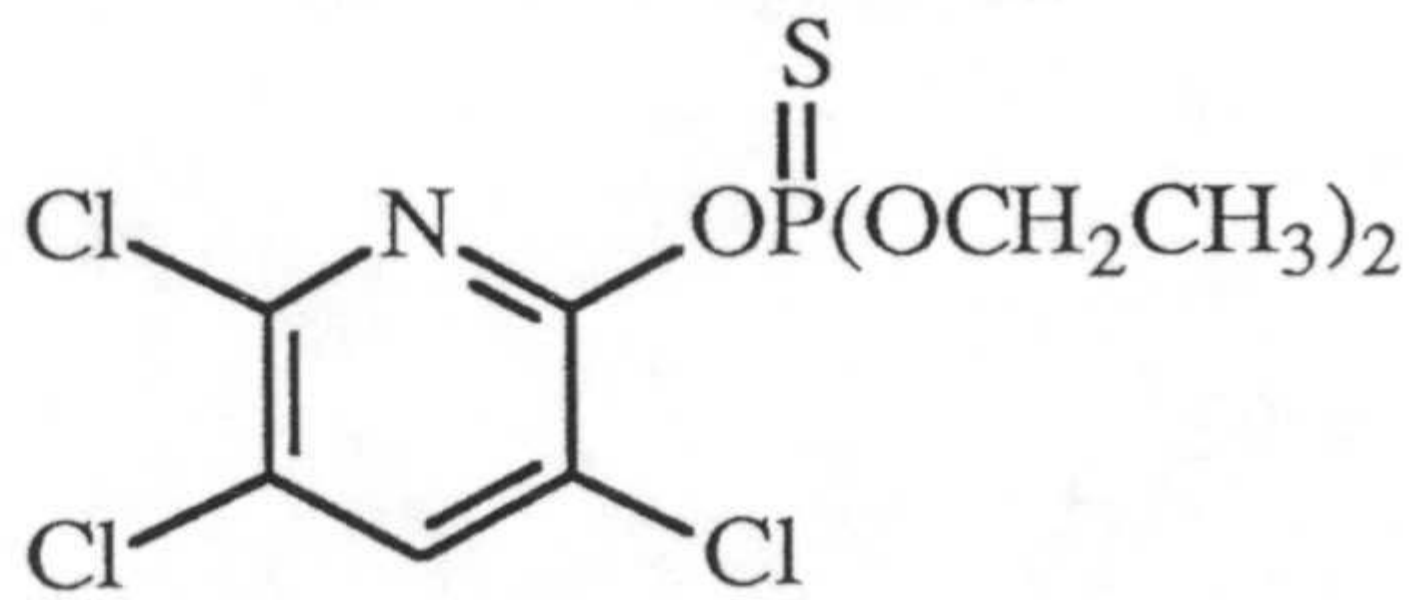
**Paration metil**



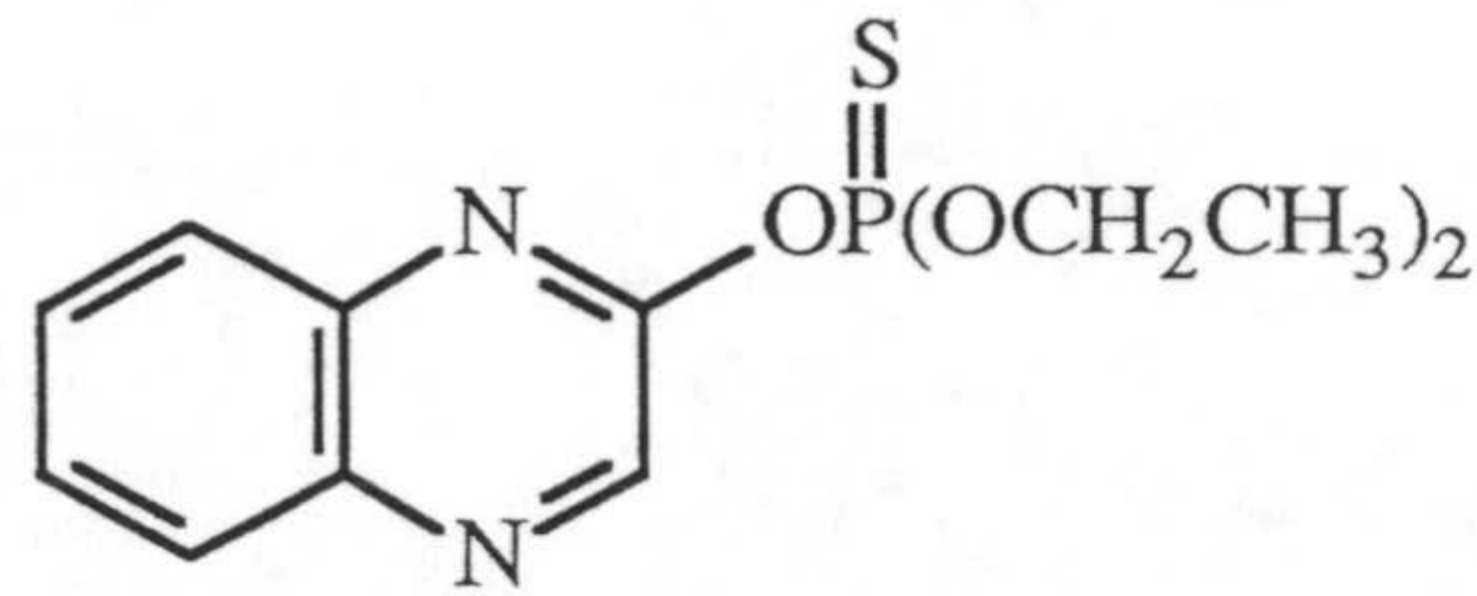
**Piridafention**



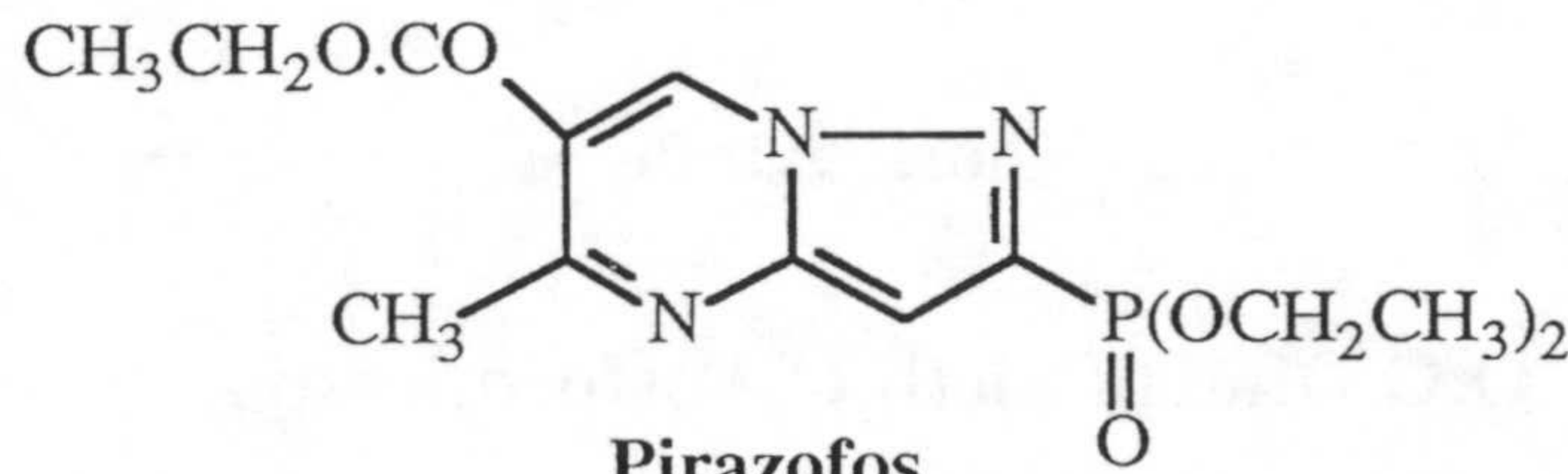
**Triazofos**



**Clorpirifos**

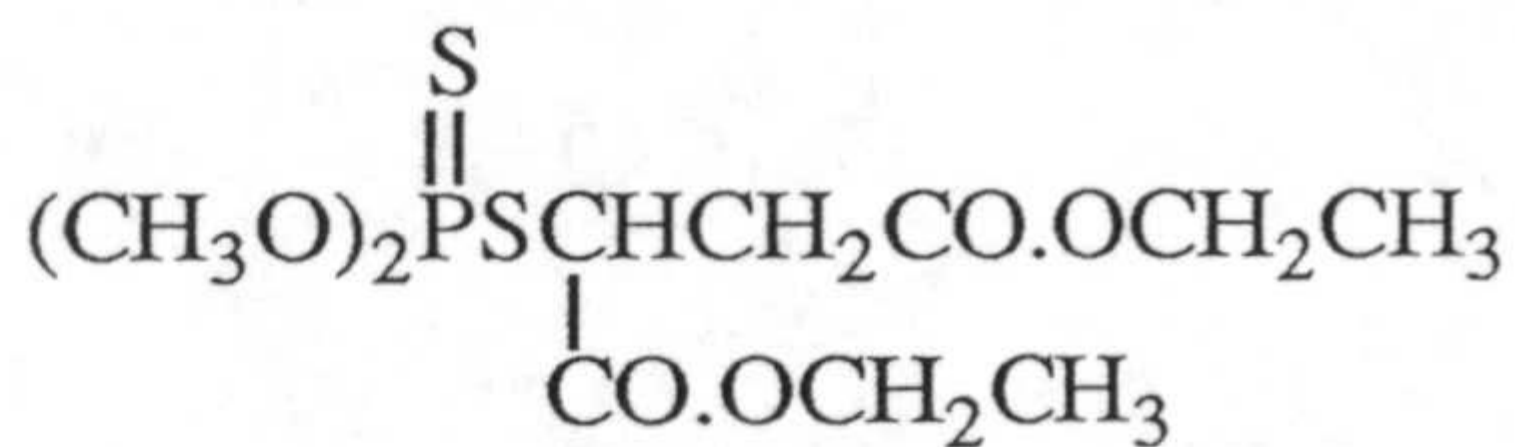


**Quinalfos**

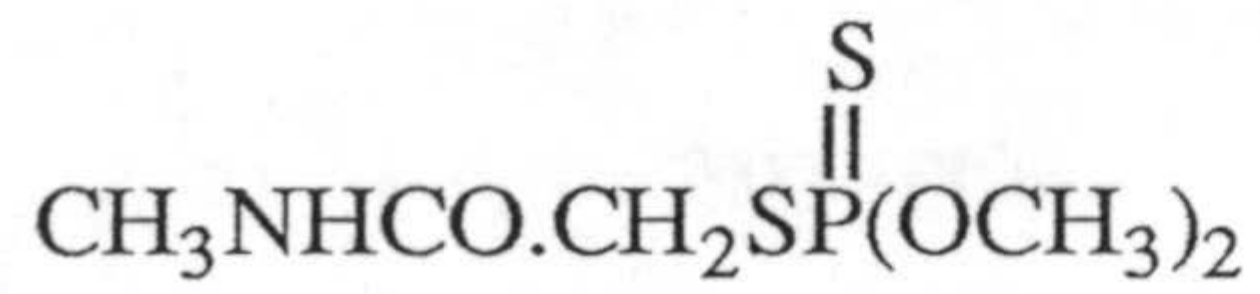


**Pirazofos**

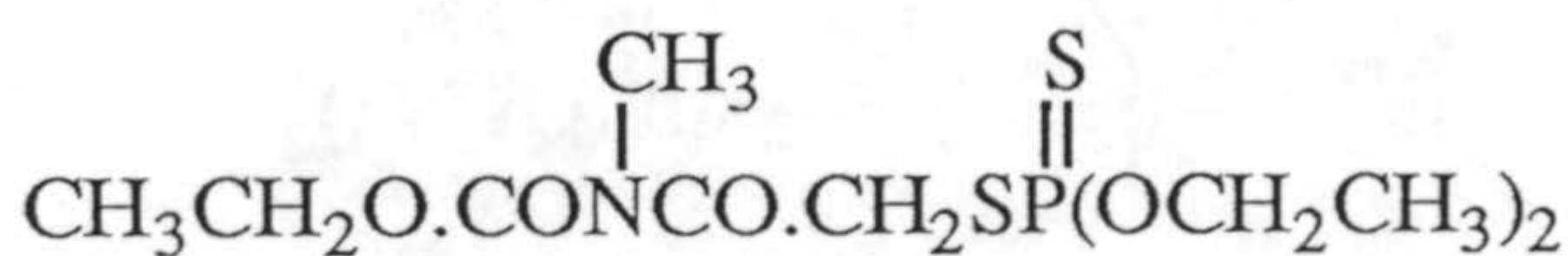
**O,O Dimetil/dietil O-Fosforoditioatos**



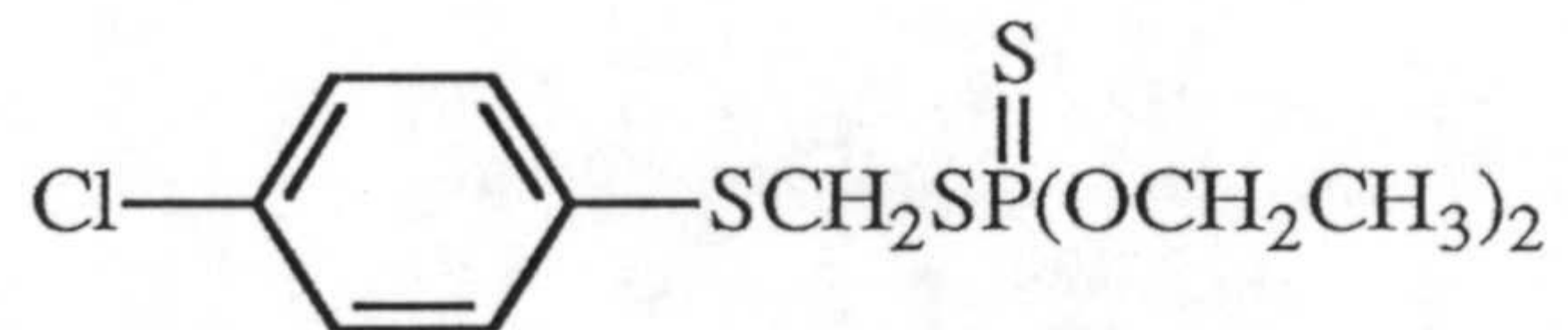
**Malation**



**Dimetoato**



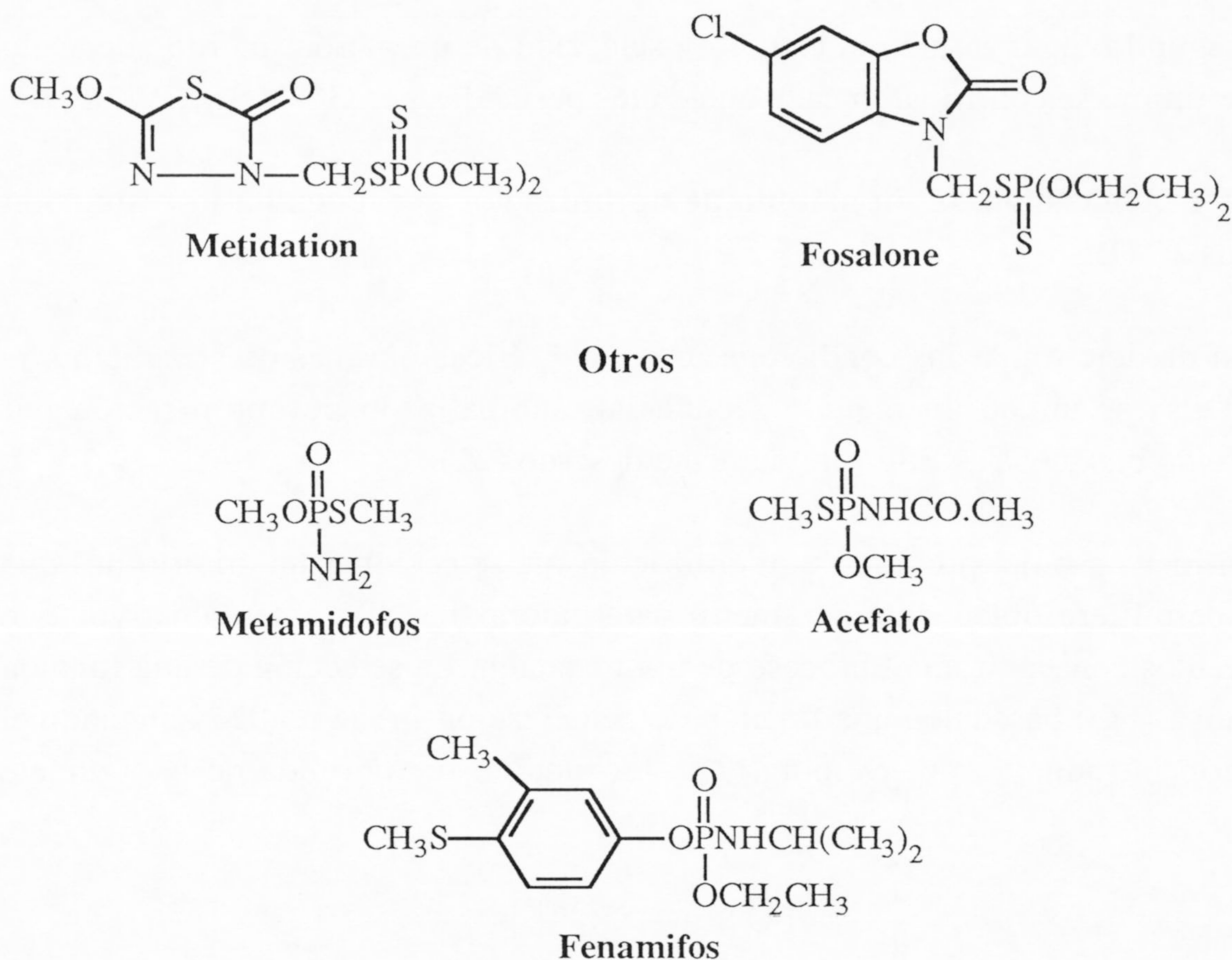
**Mecarban**



**Carbofenotion**

*Figura 3.1.(cont)-Estructuras de los pesticidas OPs estudiados.*





*Figura 3.1.(cont)-Estructuras de los pesticidas OPs estudiados.*

### 3.2.- METODOS EXPERIMENTALES.

#### 3.2.1.- Análisis cromatográfico.

El análisis de éstos compuestos se realizó mediante cromatografía de gases con detector fotométrico de llama GC-FPD. El primer paso en nuestra investigación fue la obtención de las condiciones cromatográficas que nos permitieran obtener la mejor resolución para los 25 pesticidas estudiados en el menor tiempo de análisis. Según datos preliminares se comprobó que cuatro pares de picos presentaban una especial tendencia a la coelución: Dimetoato-Clorpirifos metil, Clorpirifos-Paration metil, Malation-Fenitroton y Quinalfos-Clorfenvinfos. El método desarrollado fue optimizado con el fin de obtener los mejores resultados posibles.



En segundo lugar se hizo el estudio y selección de un patrón interno adecuado y por último se confirmaron cada uno de los pesticidas por GC-MS y GC-NPD.

### 3.2.1.1 Aplicación de un método de optimización secuencial a la resolución de los 25 OPs.

A fin de determinar las condiciones cromatográficas óptimas de separación de los OPs se aplicó un método secuencial automatizado de optimización por punto de búsqueda -OPSP- previamente descrito (21).

El primer paso del proceso de optimización fue seleccionar un criterio útil que nos permitiera obtener un parámetro para valorar los diferentes objetivos que queremos conseguir en el proceso de optimización. La selección de una función objetiva (FO) basada en una función de penalización ( $p$ ) se realizó aplicando el criterio introducido por Deming (22). La función fue definida de la siguiente forma:

$$FO = n + \sum R_{i,j} + p$$

para:

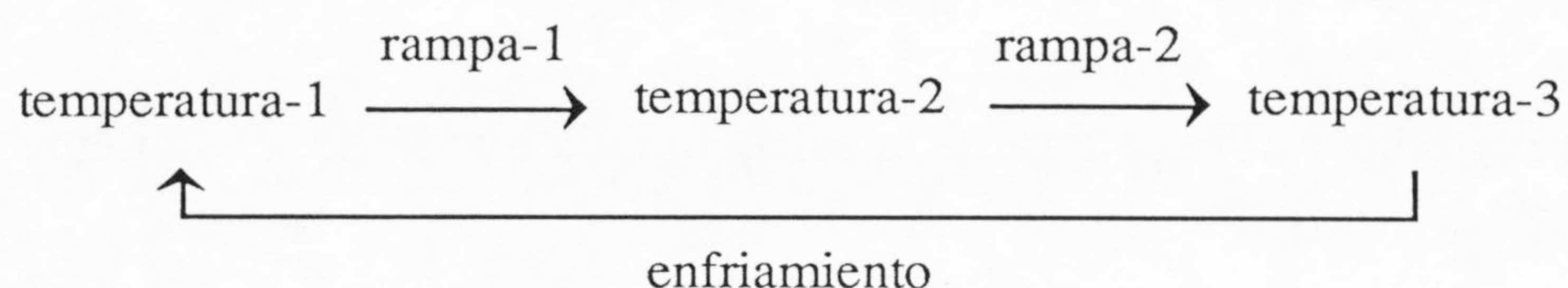
$$\begin{aligned} p &= 0 && \text{para } y < y_t \\ p &= b(y - y_t) && \text{para } y_t < y < y_t + 5 \\ p &= -\infty && \text{para } y > y_t + 5 \end{aligned}$$

Donde  $n$  es el número de picos detectados,  $R_{i,j}$  es la resolución entre dos picos adyacentes  $i$  y  $j$  ( $R_{i,j}$  está limitada a un valor máximo de 1.5 para evitar que  $\sum R_{i,j}$  distorsione el valor final de la FO),  $y$ , es el tiempo de retención del último pico considerado e  $y_t$  el tiempo máximo admitido para el último pico. A  $b$  se le asigna un valor constante de 0.2.

Para el cálculo de la FO se tuvieron en cuenta sólo los cuatro pares de picos peor resueltos con el fin de evitar una contribución innecesaria de los picos perfectamente resueltos en el valor final de la FO. La separación de esta mezcla de pesticidas está enfocada al análisis en rutina de muestras de hortalizas frescas, por lo que los requerimientos en cuanto a tiempo total de análisis son importantes. El tiempo de retención máximo aceptable para el último pico se fijó en  $y_t = 20$  min.



El siguiente paso fue definir la variable espacio o región de búsqueda. En base a los datos obtenidos de la bibliografía (23) y a la experiencia previa, seleccionamos el siguiente ciclo de temperatura programada:



Se realizaron cinco pruebas preliminares en las que se asignaron diferentes valores a las variables temperatura-1, rampa-1, temperatura-2 y rampa-2, con el fin de determinar que variables y en que rangos de variación era conveniente optimizar. Ver Tabla 3.1.

Se seleccionó una temperatura final de 260°C como la más adecuada ya que temperaturas superiores podrían provocar el sangrado de la columna. Se fijó también la variable rampa-1 en 30°C/min con el fin de acortar el tiempo total de análisis ya que no existen problemas de separación en esta zona inicial del cromatograma. De este modo nos quedaba un espacio de tres variables: temperatura-1, temperatura-2 y rampa-2 con rangos entre 90-110°C, 180-240°C y 2-10°C/min respectivamente, que fue usado en el proceso de optimización.

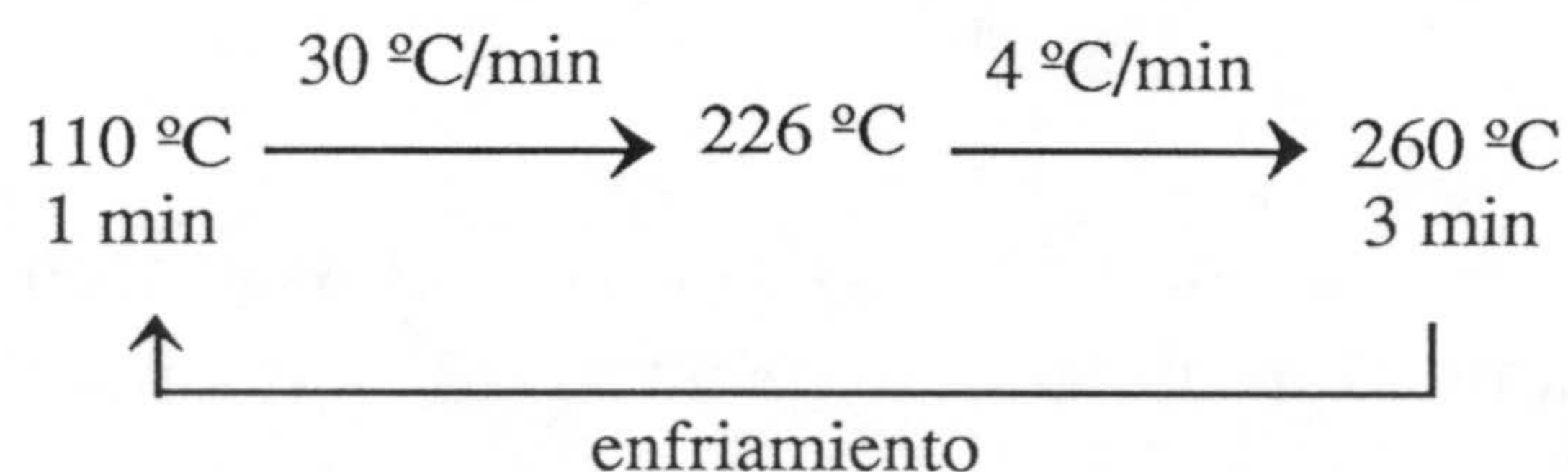
**TABLA 3.1**  
*Pruebas previas al proceso de optimización*

Temp-1 (°C)	Rampa-1 (°C/min)	Temp-2 (°C)	Rampa-2 (°C/min)	Temp-3 (°C)	Valor de FO
100	10	210	2	260	0
100	30	210	2	260	10,02
100	10	210	10	260	8,76
100	30	210	10	260	9,72
120	20	230	5	260	9,43



Se realizaron así una serie de experimentos guiados por el algoritmo de búsqueda. Este algoritmo estaba incluido en un programa de ordenador desarrollado por nosotros y que nos permitía fijar los puntos experimentales de forma automática en base a las respuestas obtenidas. Las condiciones óptimas se alcanzaron después de realizar 23 experimentos.

La rampa de temperatura programada seleccionada quedó de la siguiente forma:



### 3.2.1.2. Confirmación del método cromatográfico.

A fin de confirmar que los picos estudiados correspondían con los pesticidas objeto de estudio, se analizaron soluciones patrón conteniendo los compuestos de interés por GC-MS en Impacto Electrónico (IE) y a escala completa en el rango  $m/z$  de 30 a 600.

También se utilizó como método de confirmación la inyección en otro cromatógrafo de gases equipado con un sistema de detección diferente (NPD), y una columna (HP-1) y condiciones cromatográficas distintas.

### 3.2.1.3. Selección de un compuesto para su uso como patrón interno.

Se consideraron cuatro compuestos para su uso como patrón interno. Tres de ellos, Clormefos, Fention y Demeton-S-Metil, son pesticidas OPs que no se usan habitualmente en los cultivos hortícolas del Poniente Almeriense, y el Trifenilfosfato se ha descrito como patrón interno en el método EPA 507 y National Pesticide Survey Método 1 (24).

Para determinar la efectividad como patrón interno de estos compuestos, se calcularon los tiempos de retención en la rampa anteriormente descrita así como el factor de respuesta del detector para cada uno de ellos.



Se calculó también la recuperación, utilizando el método de extracción propuesto, con el fin de estudiar la posible aplicación de estos compuestos como patrones de recuperación en los estudios de control de calidad. Para ello se contaminaron muestras de pimiento con 10 mL de disolución de concentraciones entre 0.60 y 1.00 mg/L.

### 3.2.2.- Método de extracción.

Diferentes muestras de laboratorio de frutas y hortalizas, obtenidas según la Directiva CE 79/700 (81), procedentes de invernaderos de la provincia de Almería (donde la mayoría de los OPs estudiados se utilizan habitualmente), fueron analizadas en nuestro laboratorio de acuerdo con el siguiente procedimiento.(Fig. 3.2)

Se pesan, de forma exacta, 50 g de muestra debidamente triturada y homogeneizada, a los que se añaden 40 g de sulfato sódico anhídrido y 100 mL de acetato de etilo. Se agita la mezcla a alta velocidad durante 5 min. El líquido sobrenadante se filtra por succión a través de un papel de filtro sobre el que se ha colocado una capa de sulfato sódico anhídrido de 20 g. La extracción y filtración se repiten una vez más. Se lava el filtro con 50 mL de acetato de etilo y los extractos combinados se llevan a sequedad en rotavapor a 40-60°C. El residuo seco se recoge en 10 mL de éter de petróleo antes de proceder al análisis cromatográfico.

Los extractos así obtenidos contienen 5 g/mL de muestra, factor que se tendrá que tener en cuenta a la hora de expresar los resultados como mg de pesticida por kg de producto vegetal.



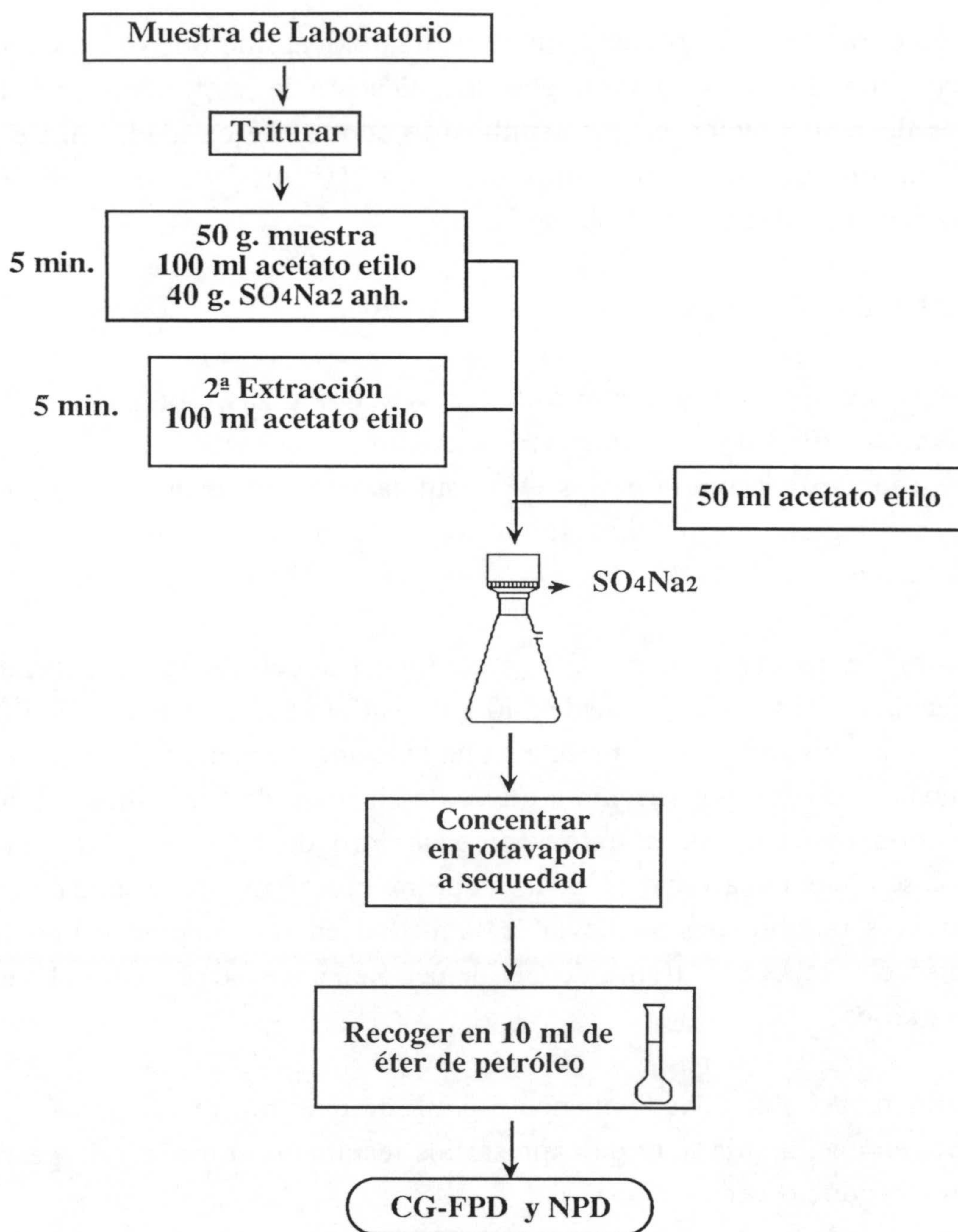


Figura 3.2.- Esquema del método de extracción aplicado a plaguicidas OPs.

### 3.2.3.- Estudios de validación del método.

Dado el interés para la aplicación en rutina en nuestro laboratorio del método propuesto, estudiamos las características necesarias para su validación. Estas características vienen definidas en términos de precisión, exactitud, rango de



linealidad, sensibilidad y selectividad. A continuación definiremos como se llevó a cabo el estudio de cada uno de estos parámetros.

*Precisión.*- Para evaluar la precisión del método se estudió la repetitividad y reproducibilidad de los tiempos de retención y de las alturas de pico, criterios fundamentales en todo sistema de separación ya que son la base para una buena identificación y cuantificación. El estudio se realizó sobre extractos fortificados de pimiento obtenidos aplicando el método de extracción descrito.

La repetitividad se determinó inyectando diez veces consecutivas un extracto contaminado con los pesticidas de interés y calculando el coeficiente de variación de las medidas.

Para la reproducibilidad se analizaron cinco extractos diferentes en días distintos.

*Linealidad.*- Se estudió el rango dinámico lineal del detector para todos los compuestos investigados. Para ello se prepararon extractos de pimiento y se contaminaron con los pesticidas de interés a diferentes concentraciones dentro del rango de trabajo y se inyectaron por triplicado, calculándose una altura media para cada nivel de concentración. Con estos datos se construyó la recta de calibrado y se calculó la regresión mediante mínimos cuadrados, obteniéndose el valor del coeficiente de correlación, la ordenada en el origen y la pendiente.

*Sensibilidad: límite de detección y límite de cuantificación.*- El límite de detección se calculó según el método de Winefordner y Long, en el cual se tiene en cuenta el efecto de los errores en la pendiente y en la ordenada en el origen de la curva de calibrado. La ecuación aplicada fue:

$$C_L = k [ s_{bl}^2 + s_{b_0}^2 + (b_0/b_1)^2 s_{b_1}^2 ]^{1/2} / b_1$$

donde  $s_{bl}$  significa la desviación estándar del conjunto de repeticiones correspondientes al blanco,  $s_{b_0}$  es la desviación estándar de la ordenada en el origen ( $b_0$ ),  $s_{b_1}$  la desviación estándar de la pendiente de la curva de calibrado ( $b_1$ ) y  $k$  es una constante que tiene en cuenta la diferencia entre una respuesta dada y la señal del blanco ( $k=3$  para el límite de detección).



El límite práctico de cuantificación se calculó a partir de la curva de calibración, correspondiendo en todos los casos con el punto inferior de ésta (excluido el blanco) siempre que la incertidumbre en este punto no difiriera en más de un 20% de la incertidumbre en el punto medio de la curva. Se comprobó con repetidos análisis de muestras contaminadas a este nivel.

*Exactitud: ensayos de recuperación.*- El hecho de no disponer de muestras certificadas de pesticidas en matrices vegetales nos obligó a realizar los ensayos de recuperación del método propuesto sobre muestras frescas de pimiento verde que no habían sido tratadas previamente y que fueron contaminadas por nosotros con los pesticidas de interés. Se hicieron pruebas a dos niveles de contaminación (0.04-0.06 y 0.20-0.30 mg/kg). La contaminación se realizó sobre las muestras ya trituradas y pesadas. Inmediatamente se aplicó una corriente de aire para evaporar el disolvente. Seguidamente se homogeneizó la muestra durante 2 minutos. Después de 30 minutos la muestra era de nuevo homogeneizada durante 1 minuto e inmediatamente analizada. Los ensayos de recuperación se repitieron como mínimo tres veces por cada nivel.

La cuantificación se hizo mediante patrón externo, comparando las alturas de los plaguicidas en las muestras y en disoluciones patrón de concentración similar.

*Selectividad: estudio del efecto matriz.*- Una vez comprobada la eficacia del método sobre muestras de pimiento, se procedió al estudio de otras matrices: pepino, judías, y uvas, procedentes de invernaderos de la provincia de Almería, con el fin de observar el efecto de la matriz en las recuperaciones, separación e interferencias con picos de interés.

Las posibles interferencias con los picos de interés debidas a la aparición de nuevos picos, con tiempos de retención similares, procedentes de la matriz se estudiaron realizando blancos de extracción para cada una de ellas.

Para estudiar el efecto de la matriz en las recuperaciones se fortificaron las muestras, usando el procedimiento previamente descrito, con los pesticidas estudiados y se analizaron como mínimo por duplicado.



### 3.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.

#### 3.3.1.- Separación cromatográfica.

Se seleccionó un espacio de tres variables para optimizar, ya que un mayor número de variables implicaría realizar un mayor número de experiencias lo que disminuiría la eficacia del método. Un paso previo importante fue la delimitación de la región de búsqueda dentro de este espacio de tres dimensiones propuesto. Para ello tuvo gran importancia la experiencia previa y las referencias bibliográficas (23). Realizamos además unas experiencias preliminares que nos ayudaron a este fin, tras las cuales el espacio de búsqueda quedó como el de la Fig. 3.3.

Sobre este dominio se aplicó el método de optimización realizándose una serie de experimentos guiados por el algoritmo de búsqueda (Fig. 3.4). Cada movimiento se realizaba en función del valor de la FO del movimiento anterior y siguiendo unas determinadas normas (21). Las condiciones óptimas se alcanzaron después de realizar 23 experiencias. La evolución de la FO durante las experiencias se representa en la Fig. 3.5. El valor máximo alcanzado fue de 11.18.

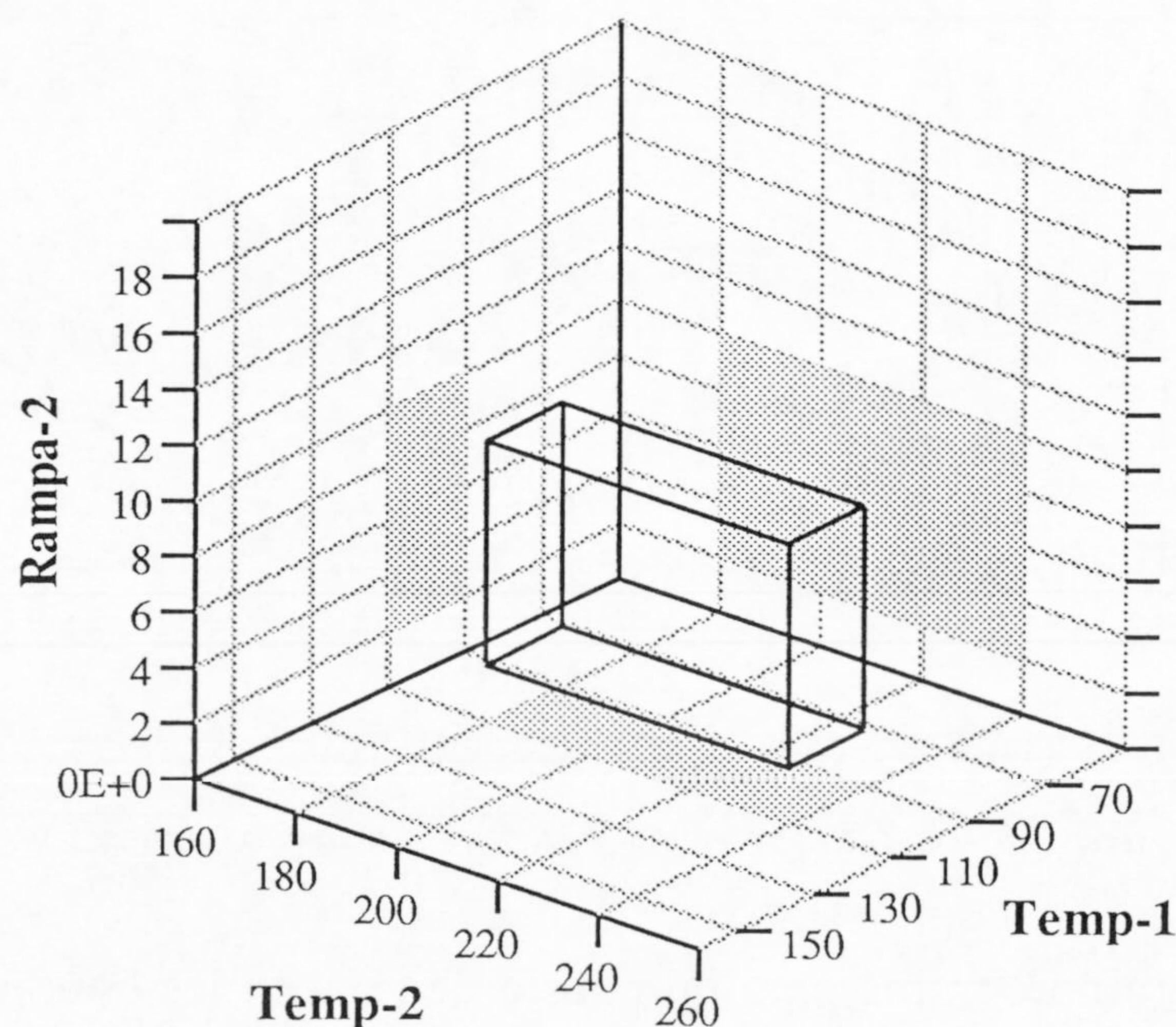


Figura 3.3.- Región de búsqueda seleccionada para la aplicación del método de optimización.



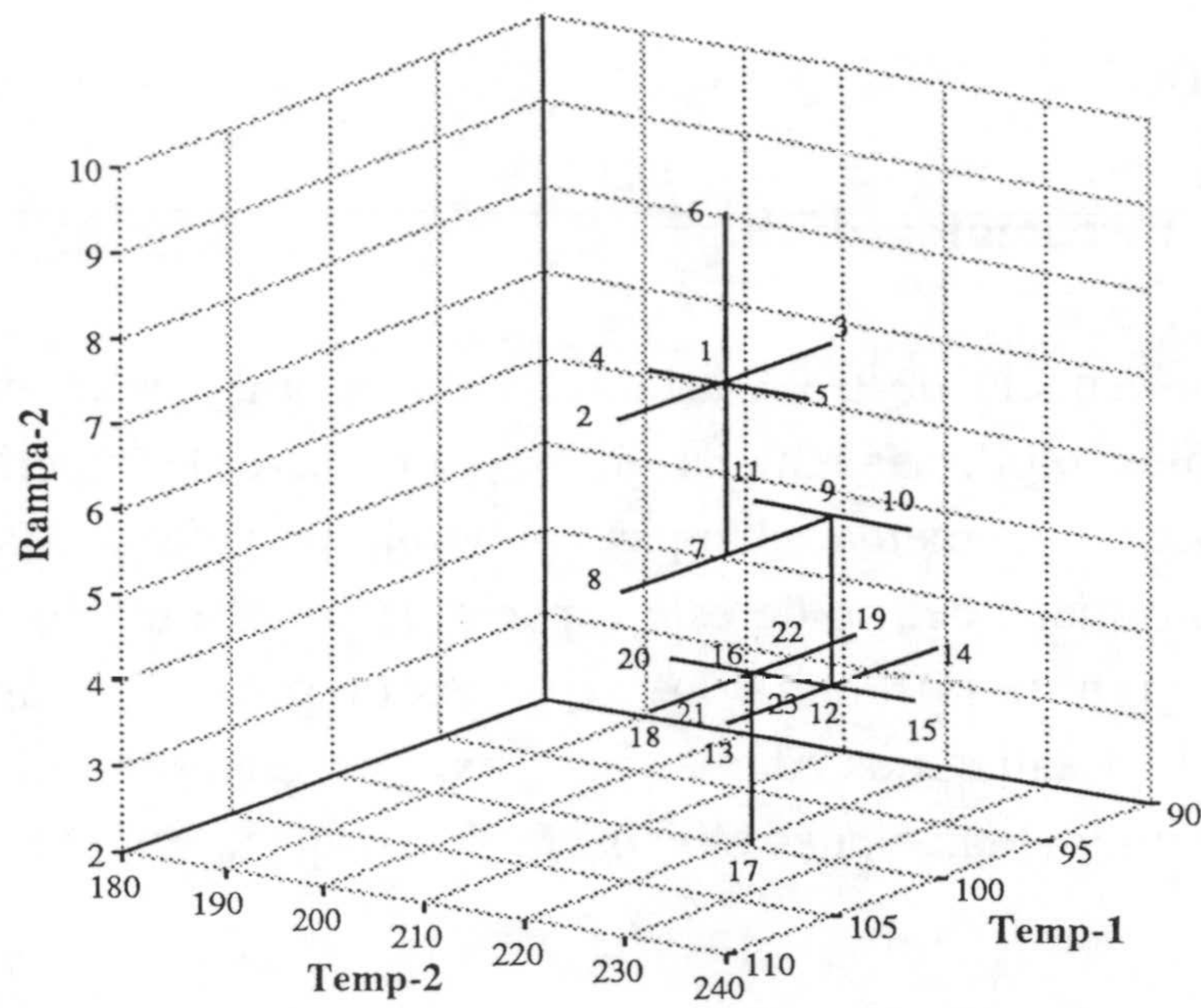


Figura 3.4.- Experimentos realizados.

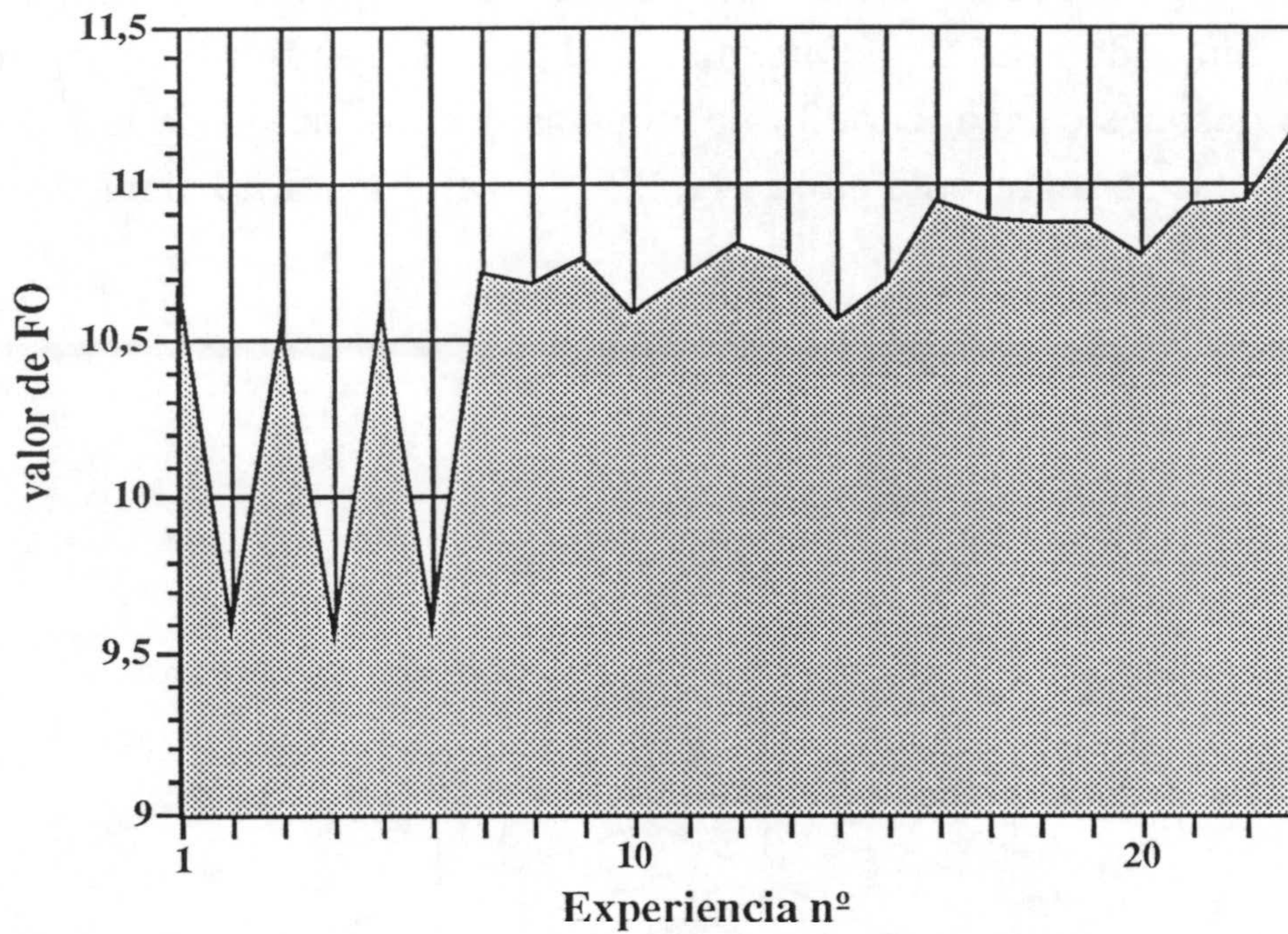


Figura 3.5.- Evolución de la FO durante las experiencias.

Un ejemplo de cromatograma para la mezcla de OPs en las condiciones óptimas seleccionadas se muestra en la Fig. 3.6(A). Los tiempos de retención de cada compuesto se dan en la Tabla 3.2.



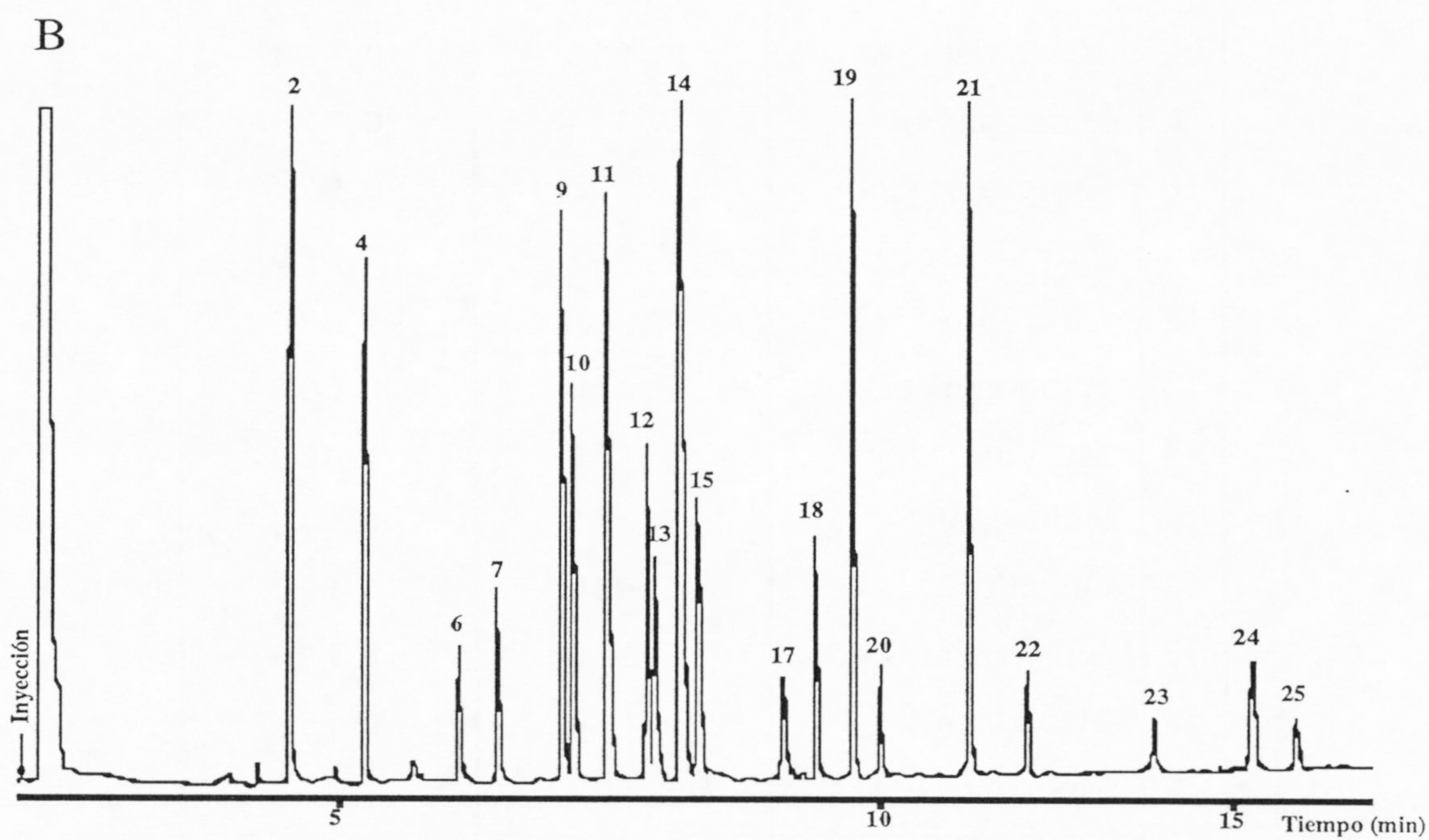
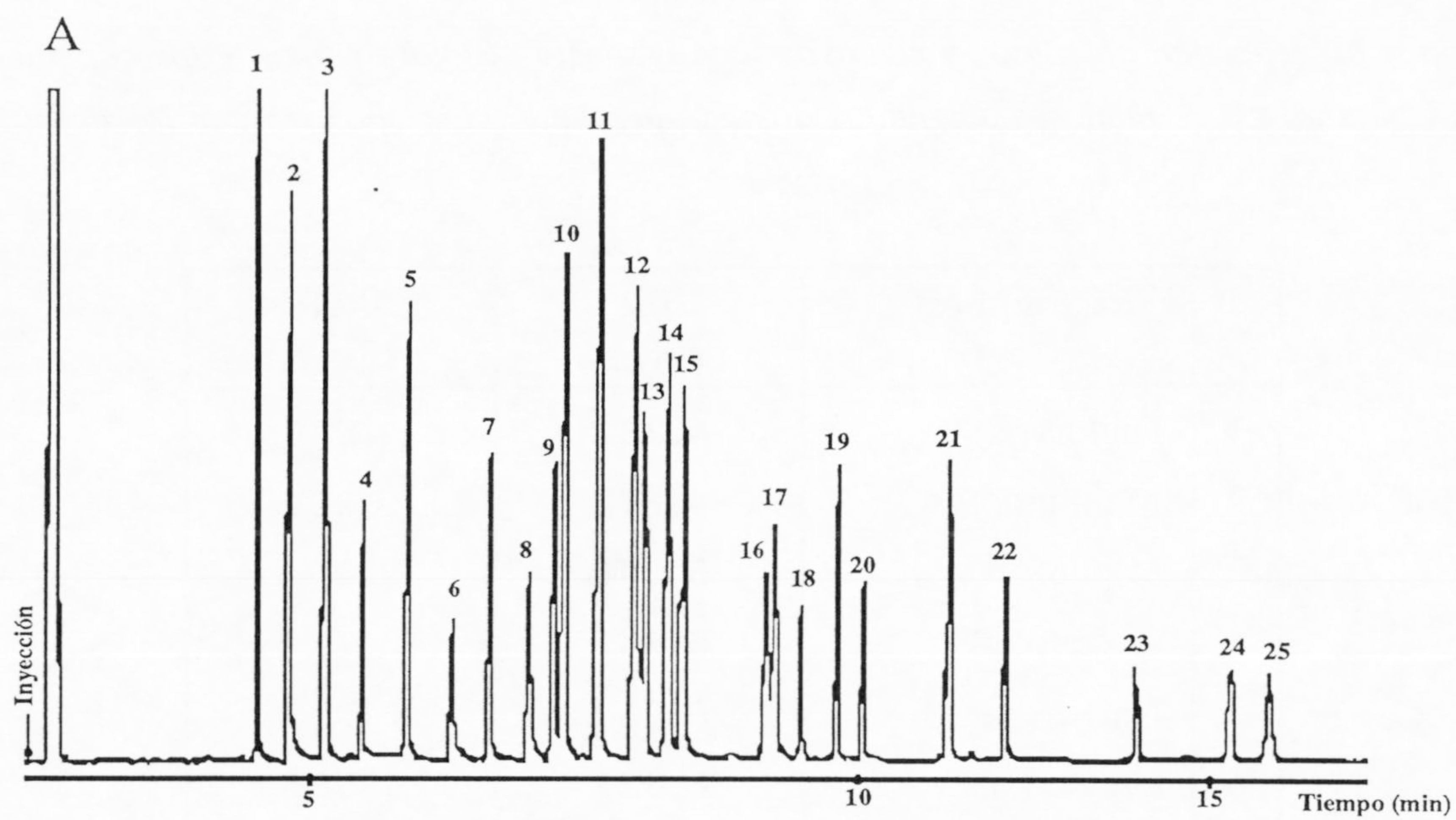


Figura 3.6.- Cromatograma de GC-FPD de la solución de trabajo, (A) en modo fósforo; (B) en modo azufre.



TABLA 3.2

Tiempos de retención absolutos y relativos (con respecto al Clorpirifos) de los compuestos OPs estudiados. Los números asignados a cada plaguicida corresponden con los de la Fig. 3.5.

Nº	Compuesto	TR (min)	TRR (min)
1	Diclorvos	4,282	0,540
2	Metamidofos	4,773	0,602
3	Mevinfos	5,272	0,665
4	Acefato	5,843	0,737
5	Naled	6,287	0,793
6	Ometoato	6,621	0,835
7	Etrimfos	6,882	0,868
8	Monocrotofos	7,168	0,904
9	Dimetoato	7,334	0,925
10	Clorpirifos metil	7,405	0,934
11	Pirimifos metil	7,651	0,965
12	Clorpirifos	7,929	1,000
13	Paration metil	7,976	1,006
14	Malation	8,159	1,029
15	Fenitrothion	8,970	1,043
16	Quinalfos	8,880	1,120
17	Clorfenvinfos	8,920	1,125
18	Mecarbam	9,134	1,152
19	Metidation	9,649	1,217
20	Fenamifos	10,054	1,268
21	Carbofenotion	11,299	1,425
22	Triazofos	11,862	1,496
23	Piridafention	13,923	1,756
24	Fosalone	15,287	1,928
25	Pirazofos	15,866	2,001



Sólo dos de los pares de picos críticos quedaron bien resueltos: Dimetoato-Clorpirifos metil y Malation-Fenitrothion. Los otros pares de compuestos, Clorpirifos-Paration metil y Quinalfos-Clorfenvinfos, aún permanecen parcialmente solapados. No obstante, el solapamiento para este último par de picos puede resolverse con la utilización del detector fotométrico de llama con filtro de azufre. Fig. 3.6(B). La ausencia de átomos de azufre en la molécula de Quinalfos nos permite confirmar este pico y cuantificar más correctamente el Clorfenvinfos.

Es de destacar el tiempo total de análisis que es un importante criterio sobre todo cuando el método se aplica en laboratorios de control. El tiempo total obtenido es de 16 minutos, más otros 5 min necesarios para la recuperación de la temperatura inicial y la estabilización del sistema que dan un total de 21 minutos por muestra. Esto quiere decir que es posible analizar hasta 68 muestras por día.

El método de optimización aplicado resultó ser simple, eficiente, con gran capacidad de búsqueda y fácil de utilizar gracias a su capacidad de automatización.

### **3.3.2.- Confirmación del método cromatográfico.**

Se confirmó el método cromatográfico propuesto por GC-MS para asegurarnos que cada uno de los picos correspondía con el pesticida asignado y no se trataban de productos de degradación generados por las condiciones del proceso cromatográfico u otras interferencias. Se analizaron así disoluciones patrón conteniendo los pesticidas estudiados que fueron identificados correctamente en todos los casos tras la comparación con los espectros de la librería.

Los principales fragmentos obtenidos y sus abundancias relativas se muestran en la Tabla 3.3. Estos resultados están de acuerdo con los diferentes "iones diagnóstico" encontrados en bibliografía para estos compuestos OPs (25-31).

También se propuso como método de confirmación para análisis de rutina el uso de otro detector, columna y condiciones cromatográficas (sistema descrito en el capítulo 2.4 de este trabajo). La diferente polaridad de la columna HP-1 dio como resultado los tiempos de retención recogidos en la Tabla 3.4.



**TABLA 3.3**  
*Principales iones y abundancia relativa de los espectros de masas de los OPs estudiados*

Compuesto	Pm	Principales iones (abundancia relativa)
Diclorvos	220	79 (20), 109 (100), 145(7), 185 (18), 220 (4)
Metamidofos	141	64 (21), 79 (14), 94 (100), 95 (58), 141 (39)
Mevinfos	224	79 (12), 109 (19), 127 (100), 192 (42), 224 (4)
Acefato	183	79 (12), 94 (66), 125 (14), 136 (100), 183 (4)
Naled	380	79 (21), 109 (100), 145(40), 185 (5), 191 (6), 301(3)
Ometoato	213	58 (22), 79 (28), 109 (28), 110 (100), 125 (17), 156 (90), 213 (3)
Etrimfos	292	56 (100), 79 (71), 93 (58), 109 (43), 125 (95), 153 (98), 181 (95), 292(36)
Monocrotofos	223	67 (24), 79 (9), 97 (14), 109 (13), 127(100), 192 (42), 223 (4)
Dimetoato	367	58 (24), 87 (100), 93 (69), 125 (52), 143 (9), 229(6)
Clorpirifos metil	321	79 (35), 93 (21), 109 (25), 125 (100), 286 (60), 288 (41)
Pirimifos metil	305	109 (44), 125 (100), 180 (47), 233 (48), 262 (29), 290 (83), 305 (57)
Clorpirifos	349	97 (47), 109 (12), 125 (22), 197 (99), 199 (100), 314 (33), 350 (4)
Paration metil	263	63 (24), 79 (30), 93 (20), 109 (100), 125 (83), 263 (35)



TABLA 3.3 Cont.

*Principales iones y abundancia relativa de los espectros de masas de los OPs estudiados*

Compuesto	Pm	Principales iones (abundancia relativa)
Malation	330	79 (19), 93 (87), 125 (100), 173 (75), 330 (3)
Fenitrothion	277	63 (16), 79 (26), 93 (24), 109 (79), 125 (100), 277 (45)
Quinalfos	298	90 (22), 118 (40), 129 (38), 146 (100), 298 (19)
Clorfenvinfos	358	81 (100), 109 (62), 125 (19), 267 (45), 323 (44)
Mecarban	329	65 (24), 97 (82), 121 (29), 125 (48), 131 (100), 159 (50), 329 (12)
Metidation	302	58 (11), 79 (9), 85 (72), 93 (21), 125 (18), 145 (100), 302 (3)
Fenamifos	303	80 (64), 109 (12), 122 (39), 154 (100), 217 (35), 260 (27), 303 (69)
Carbofenotion	342	97 (66), 121 (53), 157 (100), 342 (15)
Triazofos	313	97 (55), 109 (9), 125 (10), 161 (100), 313 (7)
Piridafention	340	77 (74), 97 (100), 109 (26), 125 (45), 188 (52), 199 (52), 340 (44)
Fosalone	367	97 (46), 121 (56), 125 (21), 121 (56), 182 (100), 367 (9)
Pirazofos	373	97 (30), 109 (8), 125(9), 176 (13), 221 (100), 373 (19)



TABLA 3.4

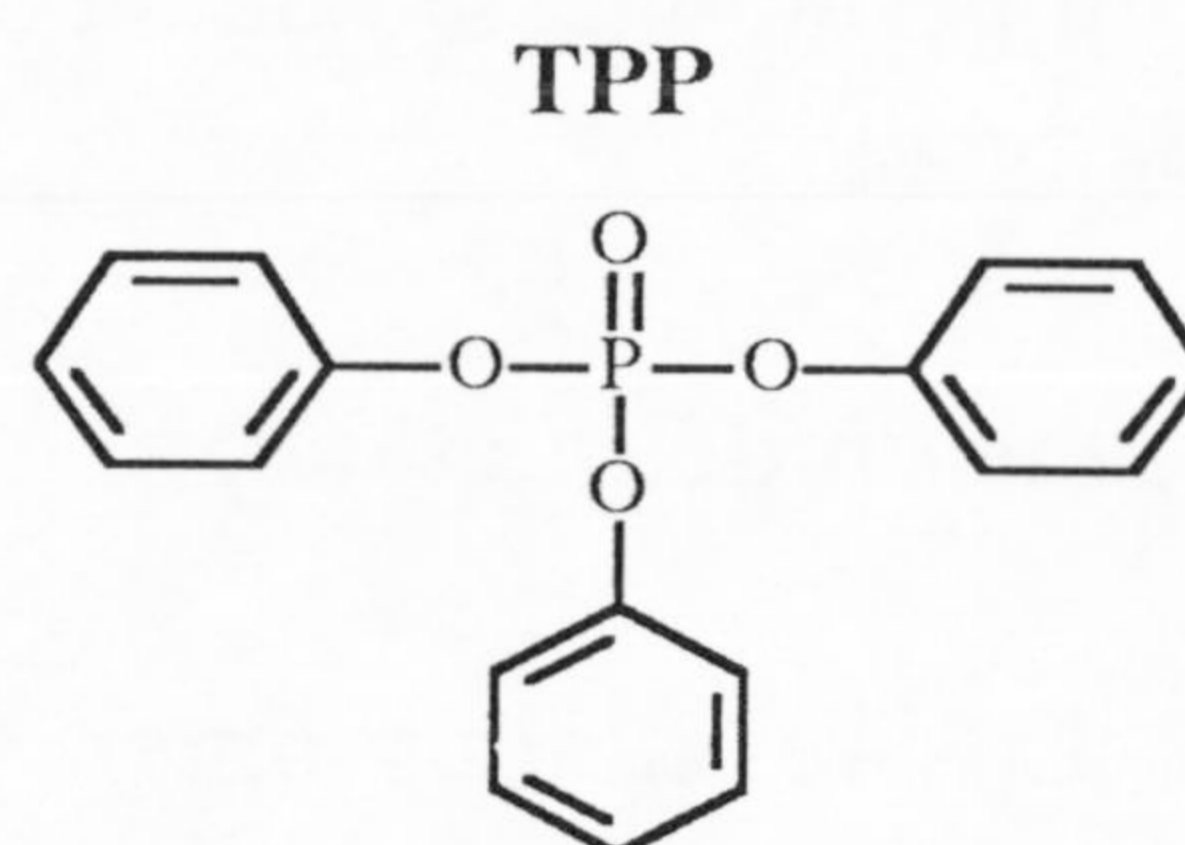
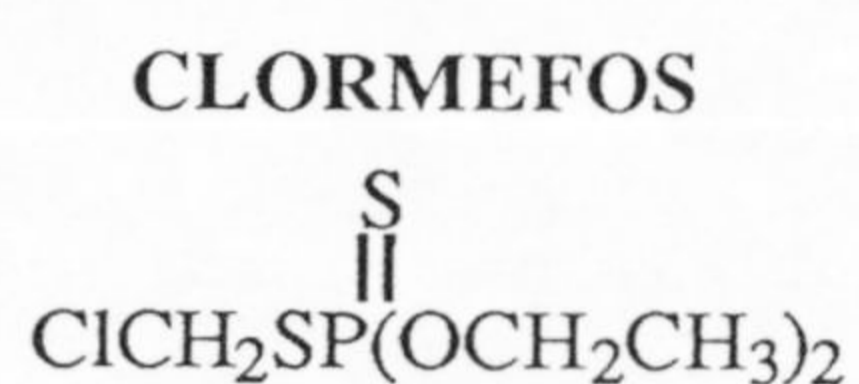
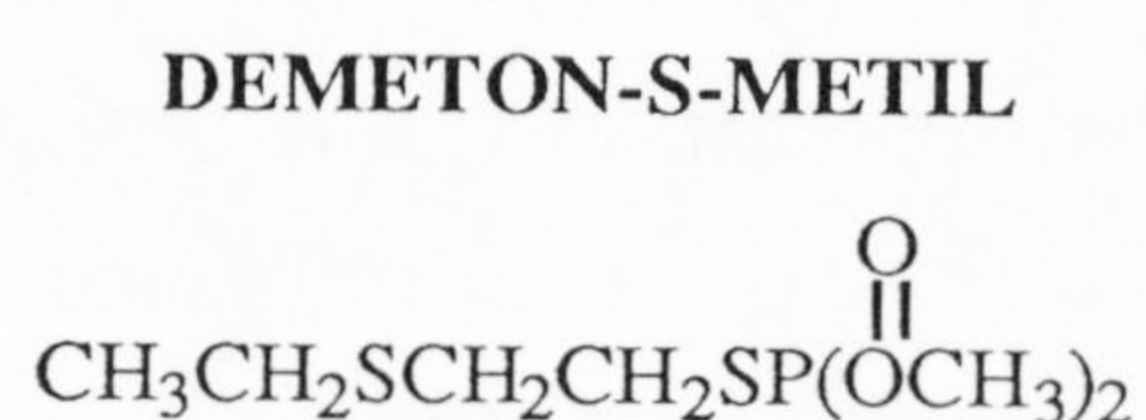
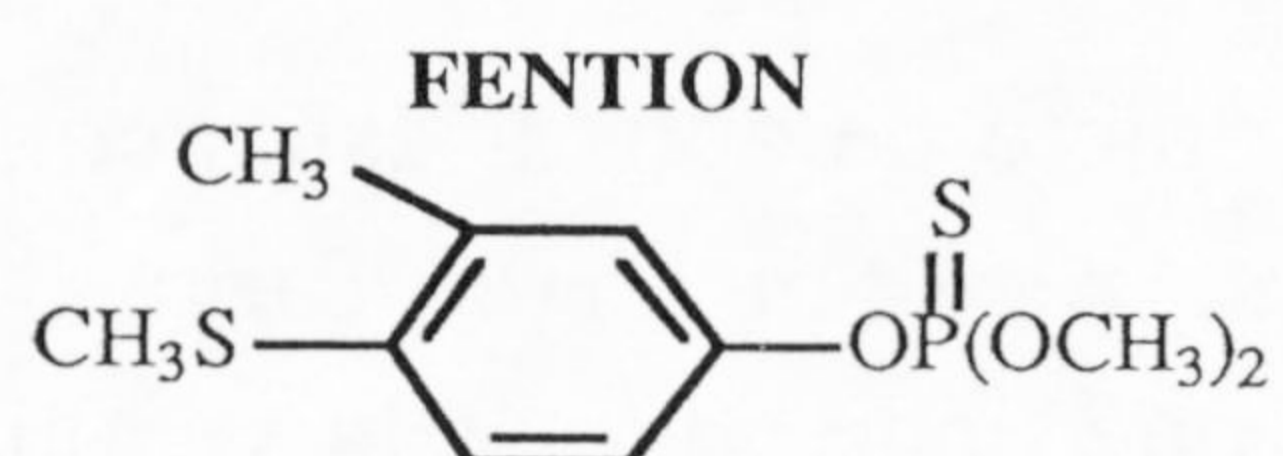
*Tiempos de retención absolutos y relativos (con respecto al Clorpirifos) de los OPs estudiados, obtenidos con detector NPD y columna HP-1. Las condiciones cromatográficas se describen en el capítulo 2.4.*

Nº	Compuesto	TR (min)	TRR (min)
1	Diclorvos	1,895	0,235
2	Metamidofos	1,760	0,218
3	Mevinfos	2,721	0,337
4	Acefato	2,715	0,336
5	Naled	4,382	0,543
6	Ometoato	3,771	0,467
7	Etrimfos	6,102	0,756
8	Monocrotofos	4,475	0,554
9	Dimetoato	4,913	0,609
10	Clorpirifos metil	6,842	0,848
11	Pirimifos metil	7,516	0,931
12	Clorpirifos	8,073	1,000
13	Paration metil	6,915	0,857
14	Malation	7,652	0,948
15	Fenitrothion	7,422	0,919
16	Quinalfos	9,198	1,139
17	Clorfenvinfos	9,024	1,118
18	Mecarbam	9,100	1,127
19	Metidation	9,284	1,150
20	Fenamifos	9,763	1,209
21	Carbofenotion	11,146	1,381
22	Triazofos	10,758	1,333
23	Piridafention	12,193	1,510
24	Fosalone	13,466	1,668
25	Pirazofos	14,372	1,780



### 3.3.3.- Selección del patrón interno.

Los compuestos que se estudiaron para su posible uso como patrón interno fueron:



En la Tabla 3.5 se recogen los datos de tiempo de retención, respuesta relativa y porcentaje de recuperación con el método descrito.

**TABLA 3.5**

*Compuestos estudiados para su uso como patrón interno.*

Nº	Nombre	Tr	Resp. Rel.	R(%)
1	Clormefos	5,093	2,52	87,0
2	Fention	8,153	3,78	88,2
3	Demeton-S-metil	9,290	2,50	79,6
4	Trifenilfosfato	12,900	3,55	91,0

La selección se hizo en base tanto al tiempo de retención como al factor de respuesta del detector. Los candidatos debían estar bien resueltos de los picos de interés, eluir próximos al tiempo medio del cromatograma y poseer una respuesta en el detector similar a la de los compuestos estudiados (dentro de un factor de 5).



De los compuestos estudiados dos coelúan muy próximos a los pesticidas estudiados (Fention y Demeton-S-Metil) y otro (TPP) eluía al final del cromatograma. Solo Clormefos cumplía todos los requisitos fijados para un patrón interno (tiempo de retención 5,05 min; respuesta del detector 2.5 veces mayor que para Clorpirifos), por lo que fue el seleccionado.

Los estudios de recuperación realizados con objeto de aplicar estos compuesto como estándares de recuperación también se recogen en la Tabla 3.5. Los mejores resultados se obtuvieron con el TPP, que tiene además la ventaja de no tratarse de un pesticida, sino de un compuesto de síntesis muy estable por lo que fue el seleccionado.

#### 3.3.4.- Validación del método.

*Precisión.* Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.6 en donde aparecen los coeficientes de variación correspondientes a los tiempos de retención y alturas de pico para análisis realizados en el mismo día (repetitividad) y en días diferentes (reproducibilidad).

Los tiempos de retención para todos los pesticidas fueron extremadamente precisos, con coeficientes de variación menores del 0.4% en la mayoría de los casos. No obstante, se dio mucha más variabilidad en la cuantificación, sobre todo cuando las pruebas se realizaban en días diferentes. El coeficiente de variación de las alturas de pico oscilaba entre el 2.5% y el 16.7%. La máxima variabilidad corresponde a los pesticidas Metamidofos, Acefato, Ometoato y Monocrotofos y Clorfenvinfos.

*Linealidad.* Se estudió el rango dinámico lineal de la respuesta del detector entre 0.15 y 50.0 ng (cantidad absoluta inyectada). Los coeficientes de correlación en todos los casos fueron superiores a 0.991. Este fue también el rango práctico de trabajo que correspondía con concentraciones en muestra de 0.01 a 3.33 mg/kg. Las muestras con niveles de pesticidas superiores eran diluídas convenientemente hasta introducirlas en rango en rango. Los datos correspondientes a: rango lineal estudiado y coeficientes de correlación se recogen en la Tabla 3.7.



TABLA 3.6

*Estudio de la precisión del método. Cálculo de la repetitividad y reproducibilidad, expresadas en términos de coeficientes de variación (%), de los tiempos de retención y alturas de pico de los OPs estudiados.*

Compuesto	Repetitividad CV(%)		Reproducibilidad CV(%)	
	TR	Altura de pico	TR	Altura de pico
Diclorvos	0,17	5,8	0,21	6,6
Metamidofos	0,17	12,4	0,20	15,6
Mevinfos	0,24	7,0	0,23	7,5
Acefato	0,26	12,1	0,27	16,7
Naled	0,28	8,3	0,31	7,8
Ometoato	0,27	9,4	0,33	10,2
Etrimfos	0,30	5,3	0,32	5,9
Monocrotofos	0,29	11,9	0,30	11,3
Dimetoato	0,30	8,5	0,31	9,9
Clorpirifos metil	0,31	2,9	0,32	3,4
Pirimifos metil	0,31	4,6	0,29	5,2
Clorpirifos	0,32	2,3	0,35	2,8
Paration metil	0,39	5,0	0,43	5,3
Malation	0,23	3,0	0,31	2,9
Fenitrothion	0,32	3,0	0,30	4,2
Quinalfos	0,35	9,9	0,39	9,8
Clorfenvinfos	0,33	11,7	0,35	12,0
Mecarbam	0,34	4,9	0,37	5,5
Metidation	0,34	5,2	0,34	5,3
Fenamifos	0,37	6,0	0,43	6,7
Carbofenotion	0,36	3,8	0,45	3,5
Triazofos	0,35	4,6	0,43	5,2
Piridafention	0,32	4,8	0,40	5,9
Fosalone	0,32	3,5	0,34	4,3
Pirazofos	0,35	2,5	0,43	2,9



TABLA 3.7

Rango lineal, coeficiente de correlación, límite de detección y límite de cuantificación de los OPs estudiados.

Compuesto	Rango lineal (ng)	r	L.D. (mg/kg)	L.C. (mg/kg)
Diclorvos	0,15-50,00	0,9992	0,009	0,03
Metamidofos	0,15-50,00	0,9999	0,003	0,01
Mevinfos	0,15-50,00	0,9991	0,002	0,01
Acefato	0,15-50,00	0,9989	0,002	0,01
Naled	0,15-50,00	0,9987	0,010	0,03
Ometoato	0,15-50,00	0,9991	0,010	0,03
Etrimfos	0,15-50,00	0,9993	0,008	0,03
Monocrotofos	0,15-50,00	0,9994	0,004	0,01
Dimetoato	0,15-50,00	0,9989	0,007	0,02
Clorpirifos metil	0,15-50,00	0,9999	0,003	0,01
Pirimifos metil	0,15-50,00	0,9999	0,003	0,01
Clorpirifos	0,15-50,00	0,9999	0,002	0,01
Paration metil	0,15-50,00	0,9999	0,002	0,01
Malation	0,15-50,00	0,9998	0,002	0,01
Fenitrothion	0,15-50,00	0,9999	0,003	0,01
Quinalfos	0,15-50,00	0,9999	0,007	0,02
Clorfenvinfos	0,15-50,00	0,9998	0,006	0,02
Mecarbam	0,15-50,00	0,9998	0,006	0,01
Metidation	0,15-50,00	0,9999	0,003	0,01
Fenamifos	0,15-50,00	0,9997	0,007	0,02
Carbofenotion	0,15-50,00	0,9999	0,002	0,01
Triazofos	0,15-50,00	0,9997	0,003	0,01
Piridafention	0,15-50,00	0,9996	0,008	0,01
Fosalone	0,15-50,00	0,9998	0,009	0,03
Pirazofos	0,15-50,00	0,9995	0,007	0,01



*Límites de detección y cuantificación.* Los límites de detección, basados en una relación señal/ruido de 3 son los que aparecen en la Tabla 3.7.

El límite práctico de determinación fue del orden de 50 pg (0.01 mg/kg) para la mayoría de los pesticidas estudiados. En todos los casos fue suficiente para los requerimientos fijados por los LMRs de la mayoría de los países en los productos estudiados.

*Estudios de recuperación.* Los estudios de recuperación se realizaron en muestras de pimiento, por ser éste el producto de mayor producción en la zona y el que origina mayor número de problemas comerciales en lo referente a su contenido en residuos de pesticidas. Se contaminaron las muestras con alícuotas de 0.50 y 2.50 mL de disolución de contaminación (con contenidos de pesticidas entre 4.00-6.00 mg/L) con los que obteníamos recuperaciones a dos niveles de contaminación: entre 0.04-0.06 mg/kg (Nivel-1 de la Tabla 3.8) y entre 0.20-0.30 mg/kg (Nivel-2).

Las recuperaciones obtenidas oscilaron, en la mayor parte de los casos, entre el 90% y el 100%. Tan solo pesticidas como Metamidofos, Mevinfos, Acefato, Naled, Ometoato, Monocrotofos y Dimetoato reportaron recuperaciones menores del 80%. Evidentemente estas diferencias en valores de recuperación son consecuencia de las diferentes propiedades físico-químicas de estos compuestos que hacen que su extracción no sea igual de eficiente en todos los casos.

**TABLA 3.9**

*Solubilidad en agua de los plaguicidas OPs de mayor polaridad.*

Compuesto	Solubilidad en agua
Metamidofos	>2kg/L
Mevinfos	miscible
Acefato	650 g/L
Naled	insoluble
Ometoato	miscible
Dimetoato	25 g/L
Monocrotofos	1 kg/kg



TABLA 3.8

Recuperaciones medias (n=5) y coeficientes de variación obtenidos en muestras de pimiento contaminadas a dos niveles de contaminación (0.04-0.06 y 0.20-0.30 mg/kg).

Compuesto	Nivel-1		Nivel-2	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Diclorvos	80,0	7,2	83,0	6,9
Metamidofos	65,9	32,8	68,4	33,9
Mevinfos	80,1	7,9	79,2	8,2
Acefato	65,3	3,2	69,1	30,8
Naled	70,2	9,9	70,2	8,4
Ometoato	63,2	19,8	65,1	21,2
Etrimfos	98,7	12,5	108,1	6,6
Monocrotofos	68,2	13,2	69,3	23,8
Dimetoato	75,5	12,5	78,8	12,7
Clorpirifos metil	95,3	10,3	94,3	6,3
Pirimifos metil	93,6	7,3	96,2	6,8
Clorpirifos	97,5	6,2	98,2	4,9
Paration metil	92,1	7,3	96,9	7,9
Malation	99,7	3,5	105,2	3,4
Fenitroion	92,6	5,3	94,4	4,2
Quinalfos	90,5	9,9	93,7	10,6
Clorfenvinfos	88,7	13,2	90,5	15,6
Mecarbam	93,7	9,9	95,7	7,5
Metidation	90,1	8,1	94,5	7,9
Fenamifos	90,2	11,9	99,9	11,6
Carbofenotion	93,0	5,3	96,0	3,7
Triazofos	95,3	8,5	100,2	8,2
Piridafention	89,7	10,2	102,1	5,9
Fosalone	86,3	8,3	99,3	6,5
Pirazofos	89,7	5,2	96,5	3,7



La disminución de la recuperación también puede deberse a procesos de degradación térmica sufridos por estos pesticidas o a reacciones con la matriz. En este sentido, un clean-up previo podría mejorar los resultados (32). Sin embargo se adopta el método sin clean-up por el ahorro de tiempo y dinero que supone. No obstante a estas consideraciones, estos valores de recuperación se consideran adecuados para un MMR (78).

No se observaron diferencias significativas entre los valores de recuperación obtenidos para cada nivel de contaminación estudiado, aunque en general, para concentraciones bajas las recuperaciones son algo menores, con coeficientes de variación mayores en la mayoría de los casos.

*Especificidad y efecto matriz.* La efectividad del método se probó, además de en pimiento, en matrices como pepino, uvas y judías verdes, cuya producción es importante en la provincia de Almería. Estas matrices fueron seleccionadas por ser diferentes entre sí en cuanto a su contenido en agua y azúcares, lo que nos da idea del comportamiento del método en condiciones diferentes. Se pretendía estudiar el efecto que la matriz ejercía en la recuperación y en la separación de los picos, así como estudiar la presencia de coextractos que pudieran interferir con los pesticidas de interés. Se comprobó la ausencia de picos interferentes por lo que los pesticidas fueron identificados correctamente en todos los casos. Cromatogramas correspondientes a muestras reales analizadas por este procedimiento se muestran en la Fig. 3.7.

Las recuperaciones en cambio sí se vieron afectadas por la matriz, como era de esperar. Los resultados se han representado gráficamente en la Fig. 3.8. Los valores de recuperación oscilaron entre el 65-111% en todos los casos, excepto para Metamidofos, Acefato, Naled, Ometoato y Dimetoato cuyos valores estuvieron en el rango entre 58-119%. Es de destacar el hecho de que las recuperaciones en pepino fueron superiores al 100% en los pesticidas 2, 4, 6, 8, 9 y 10 (Metamidofos, Acefato, Ometoato, Monocrotofos, Dimetoato y Clorpirifos-Metil).



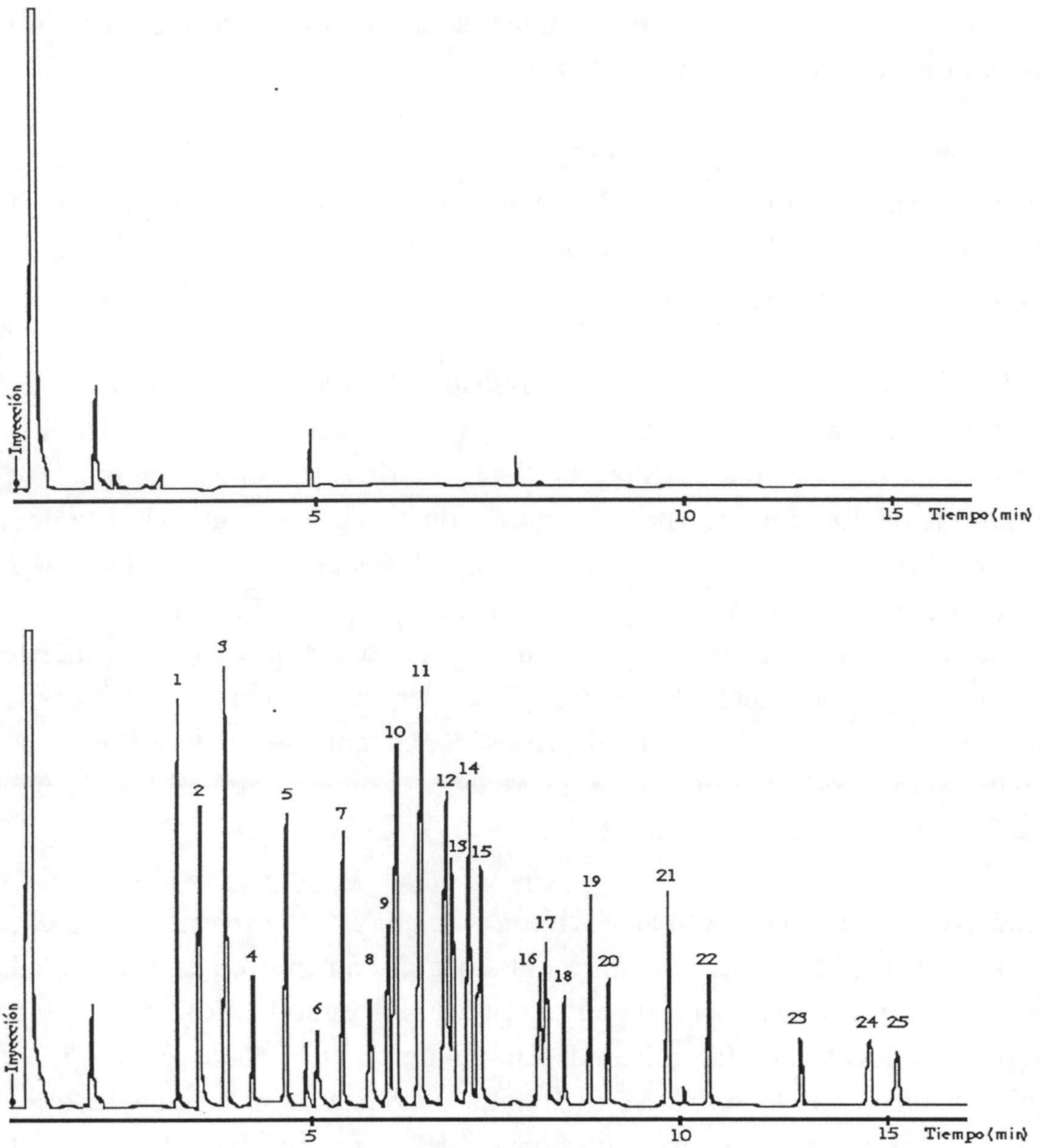


Figura 3.7.- Cromatograma GC-FPD de una muestra de tomate sin contaminar y contaminada con la mezcla OPs a nivel de 0.20-0.30 mg/L.



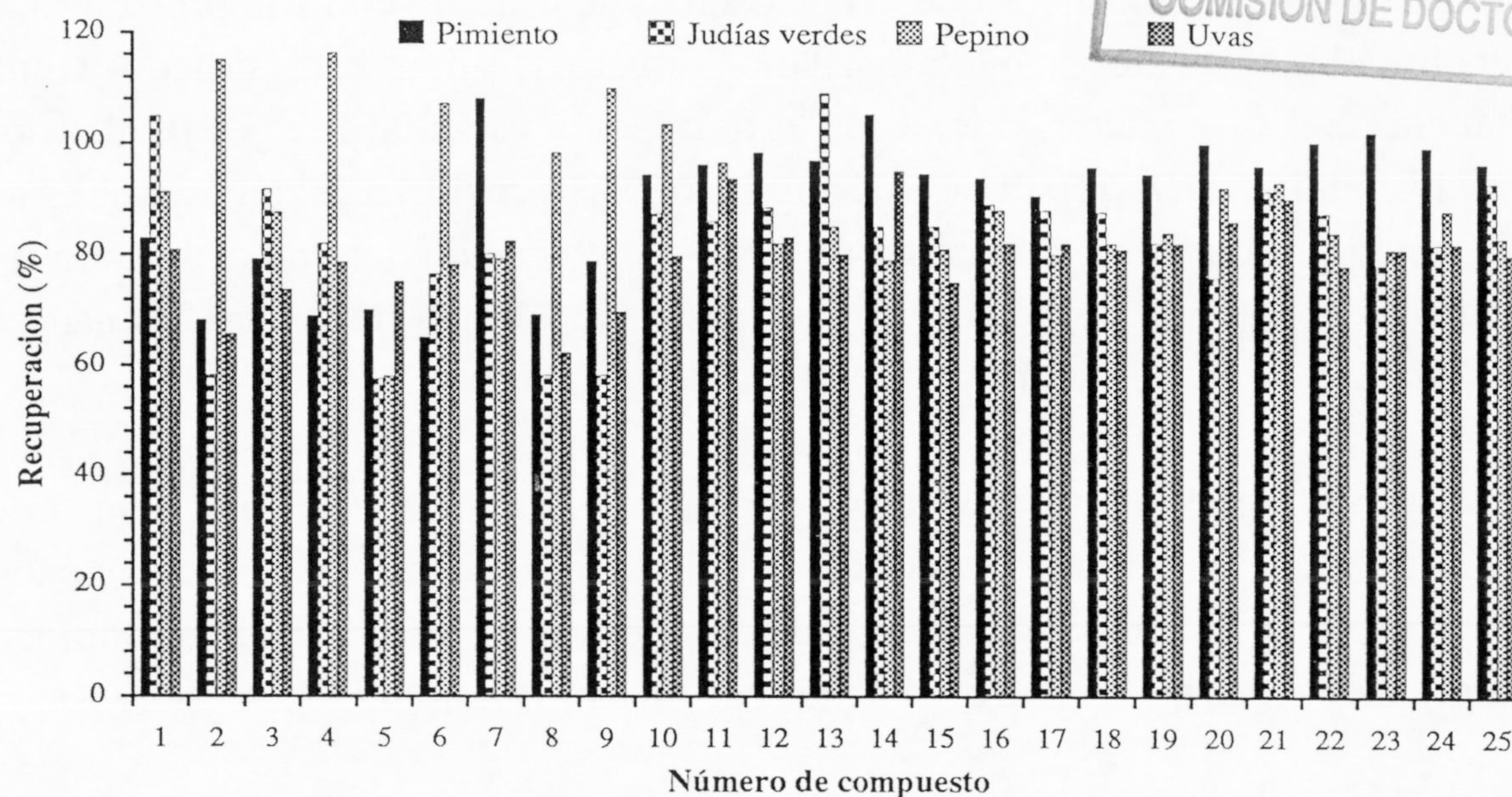


Figura 3.8.- Recuperaciones medias ( $n=2$ ) de los 25 OPs estudiados en diferentes matrices. El nivel de contaminación fue 0.20-0.30 mg/kg.

### 3.3.5 Control de calidad en análisis de rutina.

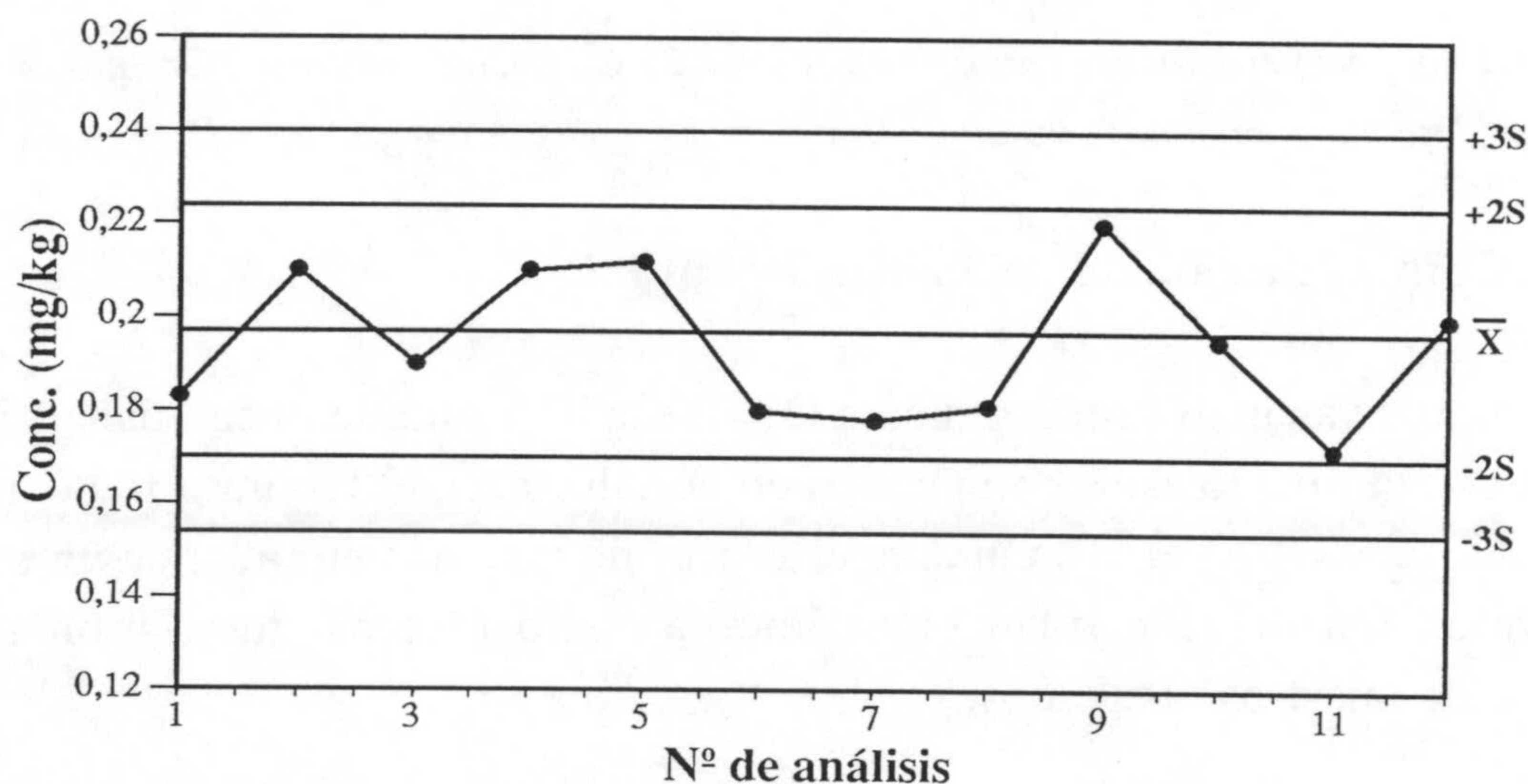
El método de análisis propuesto para OPs se aplicó durante la campaña 93/94 al análisis de rutina de estos compuestos en hortalizas, en el laboratorio de análisis agrícolas de COEXPHAL. Durante este periodo pusimos en práctica un sistema de evaluación de la calidad tanto interna como externa que garantizara la validez de nuestros resultados.

Como medida de control de calidad interno del método de extracción y con el fin de evitar errores sistemáticos difíciles de detectar, se llevaron a cabo análisis de muestras de control fortificadas por nosotros con cantidades conocidas de los pesticidas estudiados, que se incluyeron, cada cierto tiempo, en los análisis de rutina. Se escogió para estas muestras pimiento. Las muestras contaminadas se guardaron en congelador ( $-18^{\circ}\text{C}$ ). Los resultados de estos análisis se evaluaron mediante cartas de control, según Shewart. En los gráficos se representa el valor de concentración (en mg/kg) hallado para cada pesticida en función del número de análisis realizados en un cierto periodo de tiempo. El gráfico incorpora una línea central que corresponde al valor de contaminación, calculado como media de los resultados obtenidos con el análisis de seis muestras de control analizadas



después de la contaminación, antes de ser congeladas. Alrededor de esta línea se localizan los límites entre los que deben oscilar, de acuerdo con una probabilidad seleccionada, los valores medidos. Uno de estos límites está situado a una distancia de  $\pm 2s$ , es decir, dos veces la desviación estándar respecto al valor central obtenida de la repetición de los 6 análisis previos. La zona entre estas líneas incorpora aproximadamente un 95% de los resultados, de acuerdo a un proceso aleatorio con una distribución Gaussiana. El otro límite, está situado a una distancia de  $\pm 3s$  e incorpora un 99.8% de los resultados.

Se comprobó que los residuos de los compuestos de interés estaban dentro de los límites  $\pm 2s$ ,  $\pm 3s$  durante el periodo de dos meses en el que se llevaron a cabo los análisis, por lo que podemos considerarlos estables durante este periodo. Un ejemplo de las cartas de control obtenidas se muestra en la Fig. 3.9.



*Figura 3.9.- Gráfico de control según Shewhart obtenido para Clorpirifos en muestras de control contaminadas y analizadas durante un periodo de dos meses. Los análisis se realizaron cada cinco días.*

También se realizaron cartas de control para los patrones utilizados en la cuantificación de las muestras, de forma que diariamente se chequeaba el estado del equipo (estabilidad, respuesta del detector y repetitividad). Las disoluciones patrón se preparaban por dos operadores diferentes y se analizaban (por triplicado) hallándose el valor de altura media correspondiente a cada pesticida en cada disolución. Tales valores medios se comparan entre sí y si no difieren en



más de un 5% la concentración preparada se acepta como buena y éste será el valor medio del gráfico de control. Los márgenes de error permitidos se fijan en este caso entre  $\pm 10\%$  y  $\pm 15\%$  del valor de concentración.

No se observaron resultados fuera de los límites ( $\pm 3s$ ) durante al menos 15 días, almacenando las soluciones patrón a  $7^{\circ}\text{C}$ , para la mayoría de los compuestos, excepto para Naled, Metamidofos y Dimetoato para los que se recomienda una preparación más frecuente e incluso diaria. En la Fig. 3.10 se representa el gráfico obtenido para el Clorpirifos metil durante un periodo de 15 días.

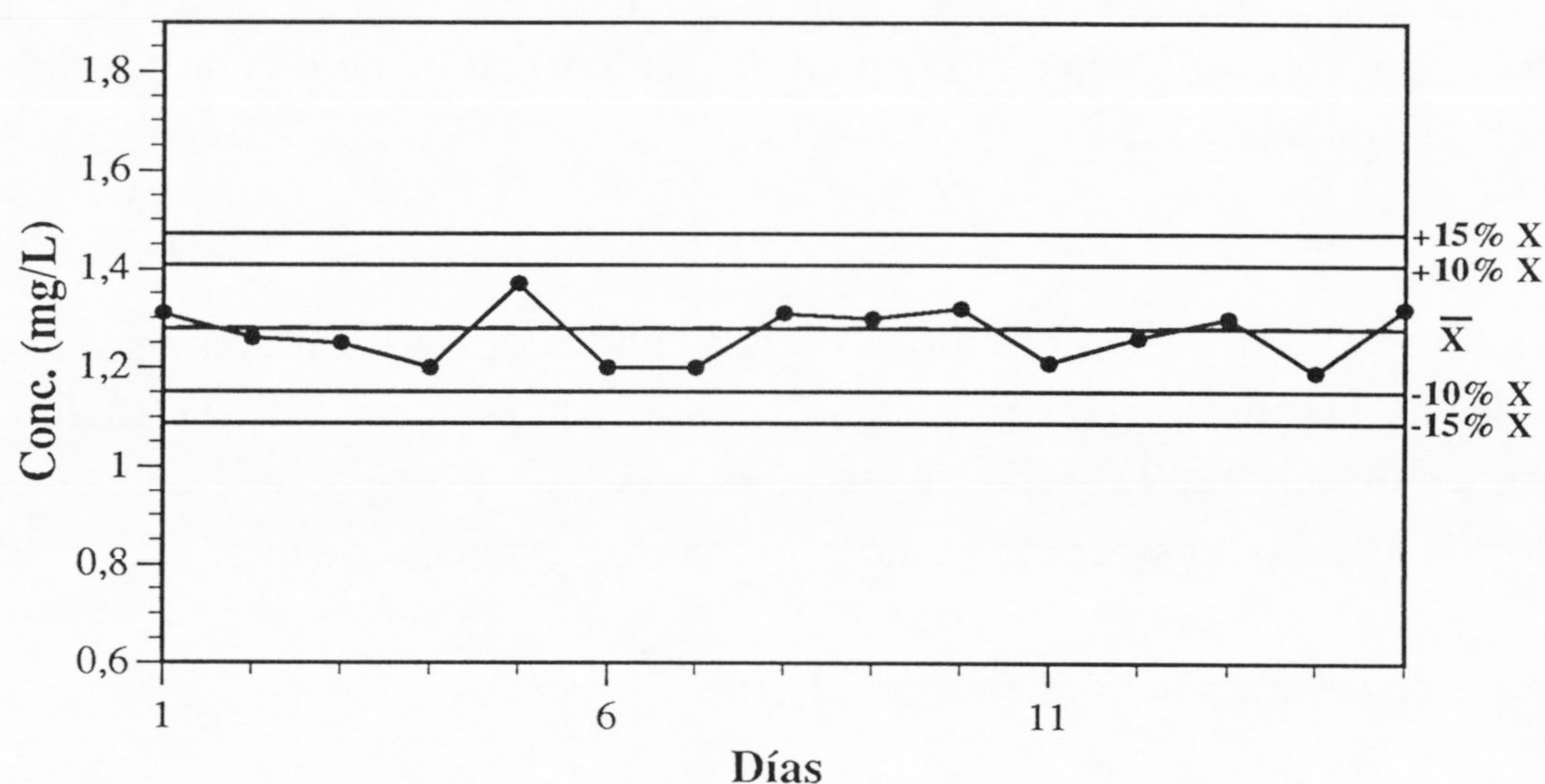


Figura 3.10.- Gráfico de control según Shewhart obtenido para Clorpirifos metil en el control diario de la disolución mezcla de patrones de trabajo. Los análisis se realizaron durante 15 días,

Otro sistema de evaluación del proceso de extracción y del sistema cromatográfico consistió en el uso de patrones de recuperación. Una cantidad conocida de un patrón era adicionada sobre la muestra ya triturada y pesada a la que se iba a aplicar el método descrito. Se seleccionó TPP como patrón más adecuado. Si una vez obtenido el extracto y realizado el análisis, la recuperación de este compuesto era menor del 80% se repetía la inyección del extracto para descartar un posible problema de inyección. Si el resultado seguía siendo malo se repetía el proceso de extracción completo. De este modo se comprobaban la extracción y la inyección de la muestra así como el sistema cromatográfico



(variaciones en la sensibilidad del equipo, variaciones en los TR por problemas de fugas, etc..)

La evaluación externa del método se llevó a cabo mediante la participación en un ejercicio de intercalibración, junto con otros laboratorios de la zona del poniente almeriense. Este tipo de ejercicios son cada vez más comúnmente usados por laboratorios de todo el mundo, lo que se pone de manifiesto por el elevado número de publicaciones existentes (19, 20). El trabajo consistió en analizar muestras de pimiento verde contaminadas con un grupo de pesticidas OPs y OCs. Entre los OPs estaban Metamidofos, Clorpirifos y Pirimifos metil. Los métodos de extracción empleados por los laboratorios participantes se basaban en todos los casos en el empleo de acetona (método de Luke) o acetato de etilo. La evaluación de la calidad analítica se basó en la medida del parámetro "Z-score" definido como:

$$Z = (X - X_1) / \delta$$

Dónde: X es el valor medio dado por cada laboratorio en el análisis de cada pesticida en la muestra (en mg/kg),  $X_1$  es el valor de la concentración de contaminación (en mg/kg) y  $\delta$  es el error estándar, al que se asignó en este caso un valor de  $\pm 20\%$ , considerado como aceptable en este tipo de análisis.

El criterio de valoración de Z establecido fue:

$ Z  < 2$	Aceptable
$2 <  Z  < 3$	Cuestionable
$ Z  > 3$	Inaceptable

Los valores de Z-score obtenidos por cada laboratorio se representan en la Fig. 3.11 para el caso de Pirimifos metil y Clorpirifos. El método aplicado por nosotros corresponde con el Método 5 de la Fig.

Los resultados obtenidos con el método desarrollado fueron satisfactorios. Solo en el caso de Metamidofos se observó una gran dispersión de los resultados en las cartas de control en todos los laboratorios por lo que no se aplicó el tratamiento estadístico propuesto.



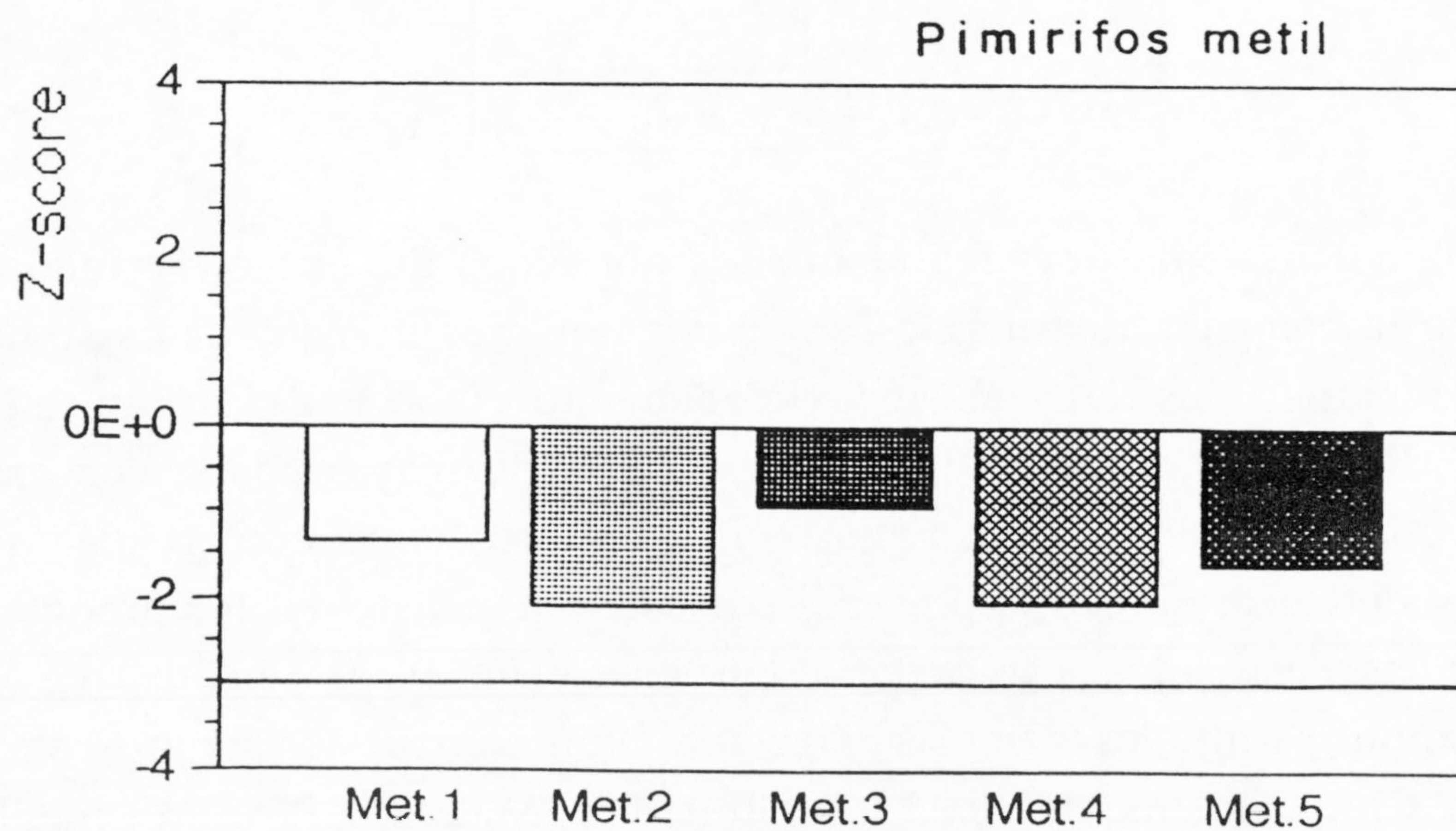
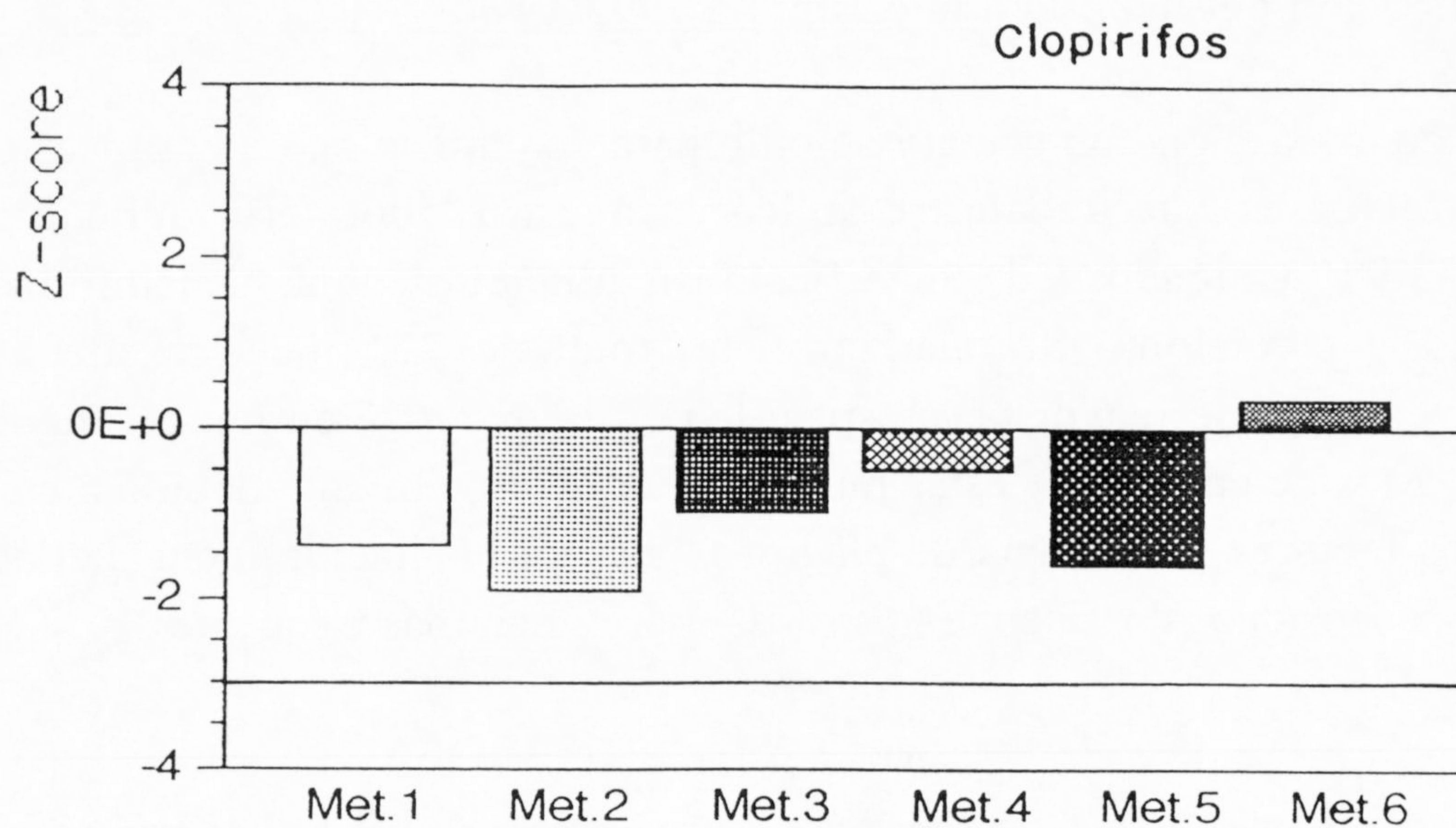


Figura 3.11.- Valores de Z-score obtenidos para cada método. El método aplicado por nosotros corresponde con el Método 5 de la Fig.



### 3.3.6.- Aplicación del método a la campaña 1993/1994.

El método de extracción con acetato de etilo para determinación de compuestos OPs desarrollado en este trabajo, se aplicó en nuestro laboratorio durante la campaña 93/94 poniéndose de manifiesto su alta eficiencia, sensibilidad, selectividad y precisión. Se analizaron un total de 774 muestras de los productos vegetales de mayor peso específico en la exportación hortofrutícola almeriense. Más de un 70% de estas muestras fueron de pimiento debido a que, por diversos factores (incidencia de plagas, fechas de plantación, densidad del fruto, etc.) los residuos de tratamientos fitosanitarios son más frecuentes.

**TABLA 3.10**

*Distribución por productos de las muestras analizadas en la campaña de producción 1993/94.*

	nº muestras
Pimiento	546
Pepino	141
Tomate	41
Calabacín	26
Berenjena	20
TOTAL	774

En la Tabla 3.10 se muestran los resultados obtenidos durante el periodo de duración de la campaña distribuidos por productos. Según estos datos se han detectado residuos positivos en aproximadamente el 30% de las muestras analizadas. El Metamidofos es el residuo encontrado mayormente, con gran diferencia con respecto al resto. Esto explica los problemas comerciales que tradicionalmente a originado la presencia de este compuesto, en los productos hortofrutícolas destinados a la exportación, en ciertos países en los que los límites máximos permitidos eran más exigentes. Otros compuestos como Acefato, Clorpirifos, Clorpirifos metil, Diclorvos, Dimetoato, Malation, Pirimifos metil y Piridafentión, se detectaron en menor medida.



TABLA 3.11

*Residuos de plaguicidas encontrados, distribuidos por productos, en las muestras analizadas durante la campaña de producción 1993/94.*

		PIMIENTO				
		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Acefato	546	540	4	2	-	-
Clorpirifos	546	539	7	-	-	-
Clorpirifos metil	546	543	3	-	-	-
Diclorvos	546	544	-	1	1	-
Dimetoato	546	544	2	-	-	-
Malation	546	523	19	2	2	-
Metamidofos	546	315	143	50	22	16
Pirimifos metil	546	542	3	1	-	-

		PEPINO				
		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Malation	141	140	1	-	-	-
Metamidofos	141	94	30	14	2	1
Dimetoato	141	140	1	-	-	-

		TOMATE				
		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Metamidofos	41	39	2	-	-	-
Malation	41	39	2	-	-	-
Piridafention	41	38	3	-	-	-

		BERENJENA				
		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Metamidofos	20	19	1	-	-	-



TABLA 3.11 (Cont.)

CALABACIN		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Acefato	26	25	1	-	-	-

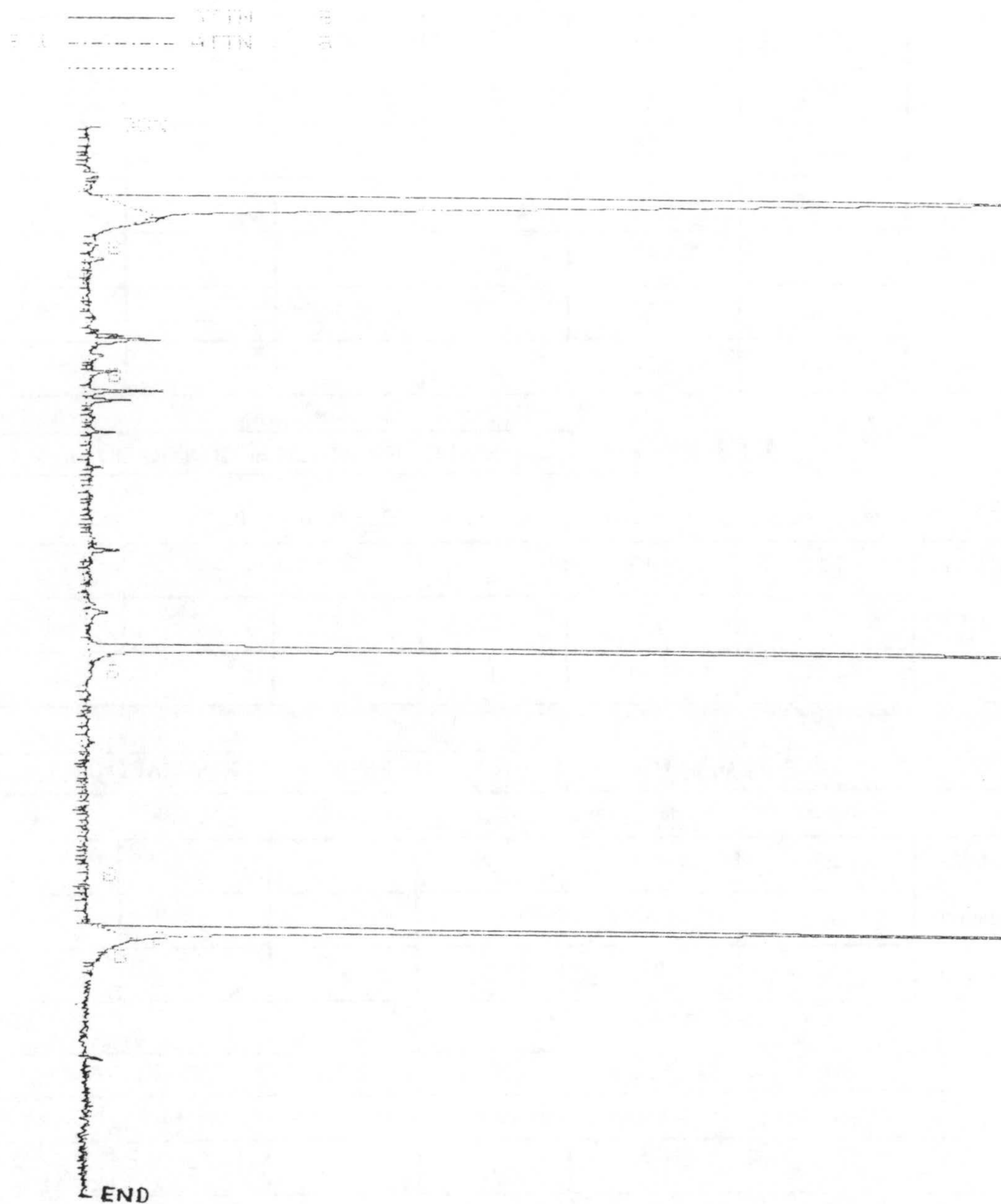


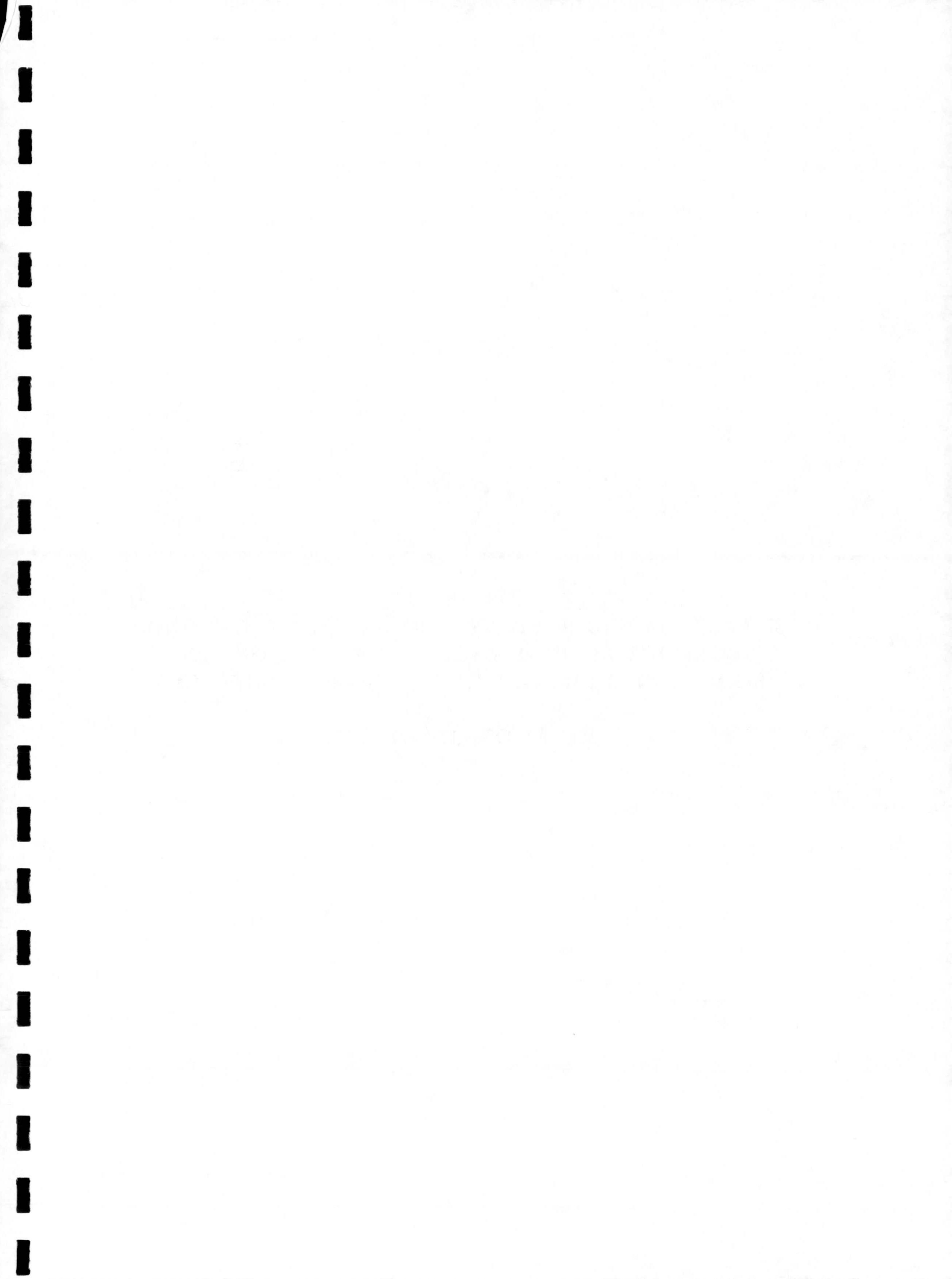
Figura 3.12.- Cromatograma GC-FPD de una muestra de pimiento obtenido con la aplicación del método desarrollado durante la campaña 1993/94.



**CAPITULO IV**

**DESARROLLO DE UN METODO MULTIRRESIDUOS  
(MMRs) PARA EL ANALISIS DE 13 PLAGUICIDAS  
ORGANOCOLORADOS (OCs) EN MATRICES VEGETALES.**







## CAPITULO IV

### DESARROLLO DE UN METODO MULTIRRESIDUOS (MMRs) PARA EL ANALISIS DE 13 PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS (OCs) EN MATRICES VEGETALES.

#### 4.1.- INTRODUCCION.

La bien conocida persistencia de los pesticidas OCs en el medio ambiente debido a su baja biodegradabilidad, junto con su biosolubilidad en tejidos grasos (35) y alta toxicidad con la consecuente incidencia en la salud para el hombre (36), ha hecho que se haya puesto gran interés en el análisis y detección de este grupo de pesticidas y sus metabolitos (44, 65-67). La técnica más usada hasta ahora es la cromatografía de gases con detector de captura electrónica (GC-ECD). Esta técnica tiene la ventaja de proporcionar un alto poder de separación y una elevada sensibilidad para estos compuestos, sin embargo la escasa selectividad de este detector hace imprescindible trabajar con extractos limpios. El método de extracción de Mills (37), que utiliza acetonitrilo como extractante, es el preferido normalmente para la determinación de estos compuestos cuando no se utilizan métodos de limpieza o clean-up en muestras vegetales, ya que este disolvente proporciona extractos más limpios que otros de similar polaridad. No obstante, presenta el inconveniente de no poder extraer los pesticidas OPs de mayor polaridad. Hoy en día, el uso de acetato de etilo como disolvente de extracción en MMRs está reemplazando con buenos resultados a otros métodos (32,44,70). Desafortunadamente, esta extracción también recupera una gran cantidad de coextractos en la mayoría de los productos. En tal caso, un eficiente clean-up es necesario previo al análisis cromatográfico.

Técnicas como la partición líquido-líquido, uso de columnas de extracción de florisil, alúmina o carbon (42, Ref) y la cromatografía de permeación de gel (GPC) (71) han sido las técnicas usadas generalmente para el clean-up de muestras vegetales.

El desarrollo en los últimos años de la técnica de extracción en fase sólida (EFS) con la comercialización de minicolumnas de extracción desechables (de florisil,



silicas químicamente enlazadas, etc.) ha proporcionado una buena alternativa a los métodos tradicionales. Si bien su uso ha sido más extendido en el análisis de fluidos farmacéuticos y aguas (14, 72, 73) también se ha aplicado a muestras con alto contenido en grasas como pescados (66), aceite vegetal (74), carne y grasa animal (75, 76) y a matrices vegetales (68, 69). Esta técnica presenta la ventaja de ser simple, rápida y con bajo consumo de disolvente.

A pesar de ser la cromatografía de gases la técnica más recomendada para el análisis de estos compuestos es necesario tener un cuidadoso control de posibles procesos de degradación que tienen lugar durante el análisis cromatográfico debido a descomposiciones térmicas o procesos de reacción en las columnas. Los fungicidas del grupo de las ftalimidas son especialmente propensos a estos procesos de degradación (39, 77).

Otra característica de este grupo de compuestos es que presentan estructuras radicalmente distintas sin grupos funcionales comunes como en el caso de OPs. De igual modo presentan propiedades físico-químicas muy diferentes lo que origina diferentes causas de error tanto en los MMRs de extracción como en el análisis cromatográfico. También en este grupo, al incluir compuestos piretroides, como Cipermetrin, se producen tiempos de análisis elevados debido a su gran retención en el sistema cromatográfico y elevado peso molecular. Esto explica el interés de desarrollar un método cromatográfico optimizado.

*Compuestos estudiados en este trabajo.* Se han seleccionado los OCs de mayor uso en la zona del Poniente Almeriense. Sus estructuras se recogen en la Fig. 4.1. Es de destacar que se ha incluido en este estudio el Cypermetrin que si bien presenta átomos de cloro en su molécula pertenece al grupo de los piretroides.



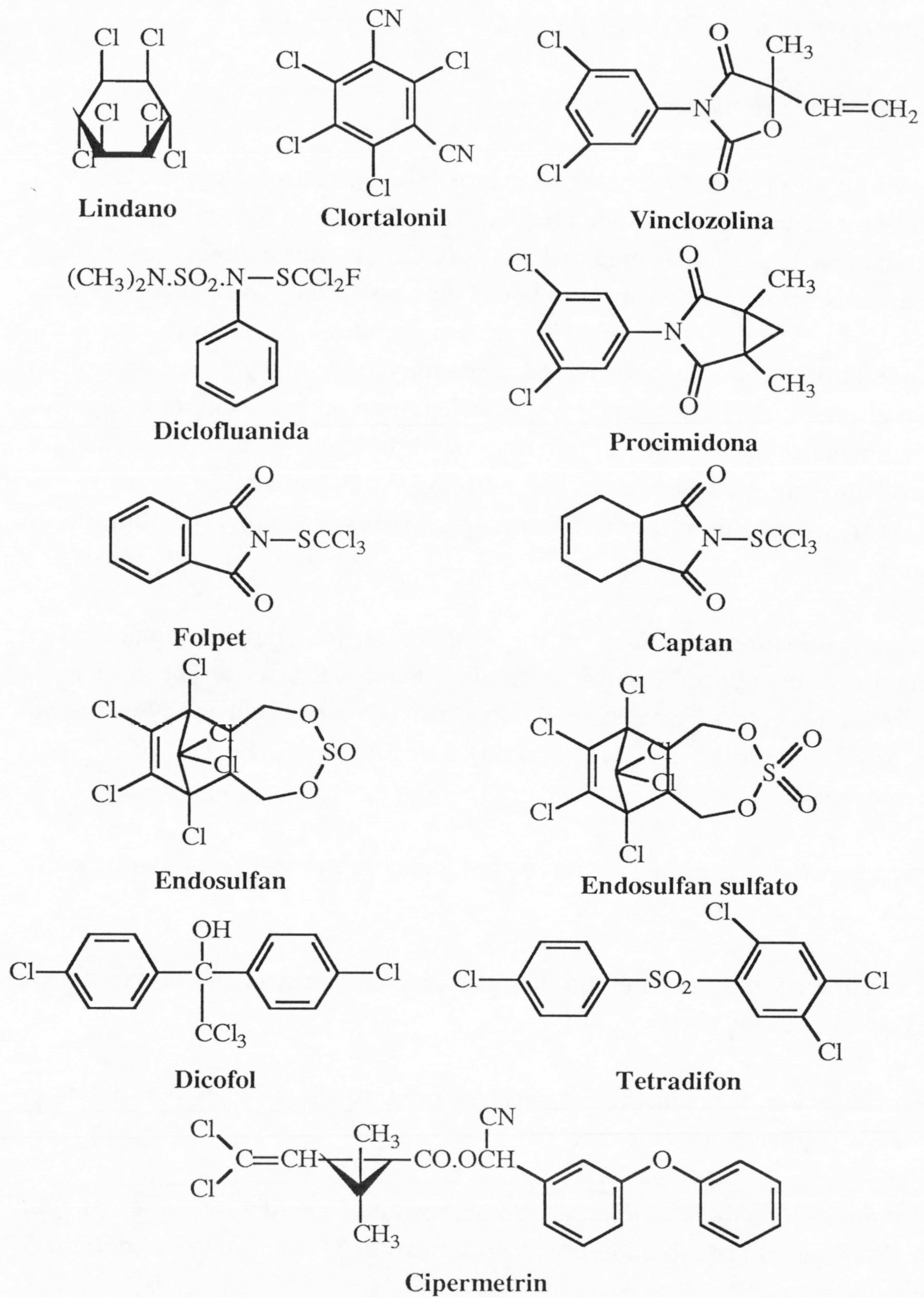


Figura 4.1.- Estructuras de los pesticidas OCs estudiados.



## 4.2.- METODOS EXPERIMENTALES.

### 4.2.1.- Análisis cromatográfico.

Debido a su alto poder de separación y sensibilidad, la cromatografía de gases con detector de captura electrónica (GC-ECD) es la técnica más utilizada para la determinación de pesticidas organoclorados (OCs) (1). Las columnas capilares y semicapilares proporcionan un alto poder de resolución. No obstante, el gran número de compuestos, de muy diferentes propiedades, que incluyen los MMRs hace que el desarrollo de éstos métodos sea muy laborioso y difícil de realizar debido al gran número de variables que influyen en un proceso cromatográfico especialmente cuando existen importantes requerimientos de tiempo. De ahí que sea conveniente la utilización de métodos de optimización guiados por ordenador que proporcionen buenos resultados con menor número de experiencias.

En nuestro trabajo se optimizaron las condiciones del análisis cromatográfico aplicando un método de optimización simultaneo ya descrito (2) al ciclo de temperatura programada seleccionado. Los pares de picos peor resueltos fueron: Lindano-Clortalonil, Diclofluanida-Dicofol, Captan-Folpet y Folpet-Procimidona.

Una vez separados adecuadamente los pesticidas se procedió a la confirmación de cada uno de ellos por GC-MS.

#### 4.2.1.1 Aplicación de un método de optimización simultaneo a la resolución de 13 pesticidas OCs.

La optimización del ciclo de temperatura programada se realizó teniendo en cuenta los siguientes parámetros.

*Selección de la función objetiva.* Se seleccionó una función objetiva (FO) basándonos en el criterio dado por Schoenmakers (3). La función se definió de la forma siguiente:

$$FO = n + \sum R_{i,j} + 1/2 (T_T - T_L) \quad (4.1)$$



donde:

$T_L$  es el tiempo de retención del último pico.

$T_T$  es el tiempo de retención máximo fijado para el último pico.

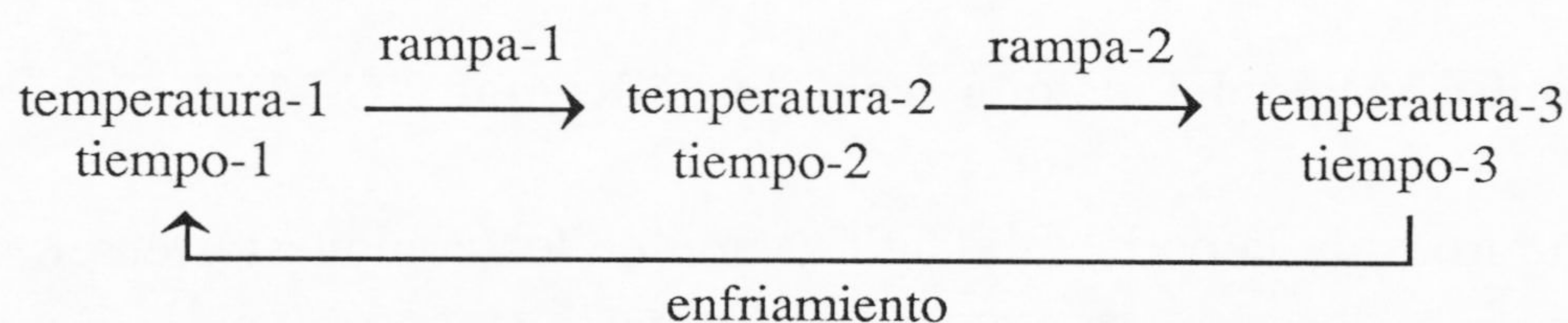
$n$  es el numero de picos detectado.

$R_{i,j}$  es la resolución entre dos picos adyacentes  $i$  y  $j$ .

El término  $(T_T - T_L)$  se incluye solo si  $T_L$  es mayor que  $T_T$ .  $\Sigma R_{i,j}$  está limitada a un valor máximo de 1.5 para evitar que  $\Sigma R_{i,j}$  tome valores muy grandes que puedan distorsionar el valor de la FO.

Para el cálculo de la FO se tuvieron en cuenta solo los cuatro pares de picos peor resueltos con el fin de evitar que picos perfectamente resueltos tuvieran una excesiva contribución en el valor total de la FO y produjeran una distorsión en el proceso de optimización. El tiempo de retención máximo aceptable para el último pico se fijó en un tiempo límite  $y_t = 25$  min, algo superior que en el caso de OPs ya que la elución de piretroides así lo requiere.

*Selección de variables.* El siguiente paso fue definir la variable espacio o región de búsqueda. En base a los datos obtenidos de la bibliografía (4) y a la experiencia previa, seleccionamos el siguiente ciclo de temperatura programada:



Se eligió una temperatura final (temperatura-3) de 260°C para evitar el sangrado de la columna. También se fijó la temperatura-1 en 150°C, el tiempo-1 en 1 min y la rampa-1 en 30°C/min con el fin de acortar el tiempo de análisis ya que no aparecen picos de pesticidas hasta el minuto 6 del cromatograma. Así se seleccionó un espacio de tres variables: temperatura-2, tiempo-2 y rampa-2 con rangos entre 180-230°C, 0-6 min. y 5-20°C/min., respectivamente, que fue usado en el proceso de optimización.

*Diseño experimental.* Se aplicó un modelo lineal de segundo orden muy general, con interacción (Eq.4. 2):

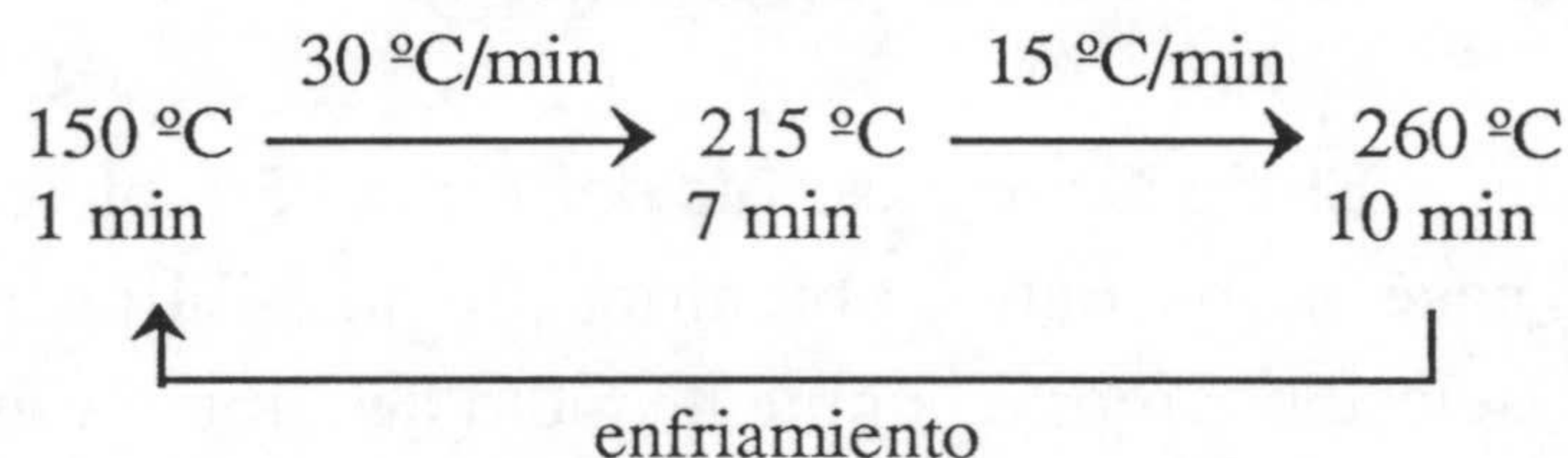


$$Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1^2+b_5X_2^2+b_6X_3^2+b_7X_1X_2+b_8X_1X_3+b_9X_2X_3 \quad (4.2)$$

donde las X son las variables independientes ( $X_1$ :temperatura-2,  $X_2$ :tiempo-2,  $X_3$ :rampa-2), Y es la variable independiente (valor de la función de respuesta cromatográfica FO para cada experiencia) y  $b_0$ - $b_9$  son los coeficientes que se han de calcular.

Lo datos experimentales se obtuvieron llevando a cabo, en orden aleatorio, 20 experimentos de acuerdo con el diseño compuesto central rotatorio propuesto por Box y Hunter (5). Cada valor de respuesta se calculó como media de dos inyecciones para cada conjunto de parámetros y los datos eran tratados por ordenador para obtener los valores de los coeficientes.

Las condiciones experimentales del óptimo seleccionadas fueron:



#### 4.2.1.2 Confirmación del método cromatográfico por GC-MS.

Para asegurarnos de la correcta identificación de los compuestos en el método cromatográfico descrito, se analizaron soluciones patrón conteniendo los compuestos de interés mediante GC-MS en modo de Impacto Electrónico (IE) y en el rango de masas de 30 a 600 u.m.a.

#### 4.2.2 Método de extracción. Estudio de clean-up del extracto mediante cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) de sílica.

Se aplicó para la extracción de este grupo de compuestos el mismo método descrito para pesticidas OPs (extracción con 200 mL de acetato de etilo y 40 g de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ). Sin embargo, la utilización en este caso de un detector menos selectivo, como es el ECD, nos obligó a disponer de extractos más limpios. Es por esto que se realizó un estudio de clean-up o limpieza de las muestras.



Múltiples métodos de clean-up han sido descritos en los últimos años, los más utilizados tradicionalmente han sido la partición líquido-líquido (6), la cromatografía de adsorción en columna y la cromatografía de permeación en gel (7,8). Todas ellas han reportado buenos resultados, sin embargo presentan dos inconvenientes: el alto consumo de disolvente y el alto consumo de tiempo necesario para su realización. Nuevas tecnologías como la extracción en fase sólida (EFS) pueden eliminar estos inconvenientes (9-13). La EFS consiste fundamentalmente en el uso de cartuchos o columnas de polipropileno, disponibles comercialmente, rellenas con una pequeña cantidad de adsorbente capaz de retener los compuestos de interés cuando el extracto es pasado a través de él sin retener las posibles interferencias procedentes del material vegetal. Seguidamente el cartucho es eluido con una pequeña cantidad de disolvente para arrastrar los pesticidas retenidos.

El uso de este tipo de técnicas de EFS requiere una secuencia de actuación en el desarrollo del método que es como sigue: 1) activación del adsorbente, (se humedeció con 2 mL de la mezcla de elución seleccionada); 2) eliminación del exceso de disolvente de activación (acondicionamiento con 2 mL de éter de petróleo); 3) aplicación de la muestra (2mL de extracto en éter de petróleo); 4) eliminación de interferencias (paso opcional); 5) elución de los analitos concentrados (2 mL de la mezcla de elución seleccionada).

La limitada capacidad del adsorbente contenido en los cartuchos (500 mg) junto con el diferente comportamiento de cada analito en cuanto a su retención en el adsorbente seleccionado, hace necesario un estudio previo de la cantidad de extracto que es posible eluir sin pérdida de los compuestos de interés (volumen de rotura). El volumen de rotura se comprobó eluyendo un extracto contaminado con los pesticidas de interés y recogiendo separadamente distintas fracciones de eluato que eran analizadas separadamente. Se comprobó que este parámetro oscilaba entre 2.5 y 3.5 mL para los pesticidas estudiados en éter de petróleo. De esta forma, un volumen de 2 mL de extracto de muestras vegetales en éter de petróleo podía ser utilizado sin peligro de pérdidas.

Otro factor importante a tener en cuenta es la selección del disolvente de elución adecuado. El comportamiento en la elución de los 13 OCs y piretroides en cartuchos de sílica se estudió mediante la aplicación de 2 mL de extracto de pimienta en éter de petróleo, conteniendo la mezcla de pesticidas, a la



minicolumna de extracción y subsecuente elución con volúmenes de 2 mL de diferentes mezclas de elución, con el fin de evitar la dilución de la muestra. Eter de petróleo con éter dietílico como modificador fue la mezcla usada en el proceso de desorción. La utilización de éter de petróleo únicamente como eluyente requería utilizar volúmenes altos de elución (5 mL) para recuperar todos los compuestos, con la consiguiente dilución de la muestra. Así se fueron probando diferentes mezclas con éter dietílico en distintas proporciones, que se analizaron separadamente por cromatografía de gases.

La reproducibilidad del proceso de elución se ve influenciada por la velocidad de flujo del eluyente (14), de modo que aumentos en el flujo pueden dar lugar a eluciones poco reproducibles. Se trabajó a una velocidad de flujo de 1-2 mL/min para conseguir una reproducibilidad óptima.

#### **4.2.3.- Estudios de validación del método.**

El estudio de validación del método se llevó a cabo de la forma descrita para el análisis de pesticidas OPs en el apartado 3.2.3 de este trabajo, con la única diferencia de que, en el análisis de OCs, los niveles de contaminación estudiados en las pruebas de recuperación fueron 0.03-0.05 y 0.20-0.30 mg/kg y el estudio del efecto matriz se realizó sobre muestras de pimiento, pepino, judías y melón.



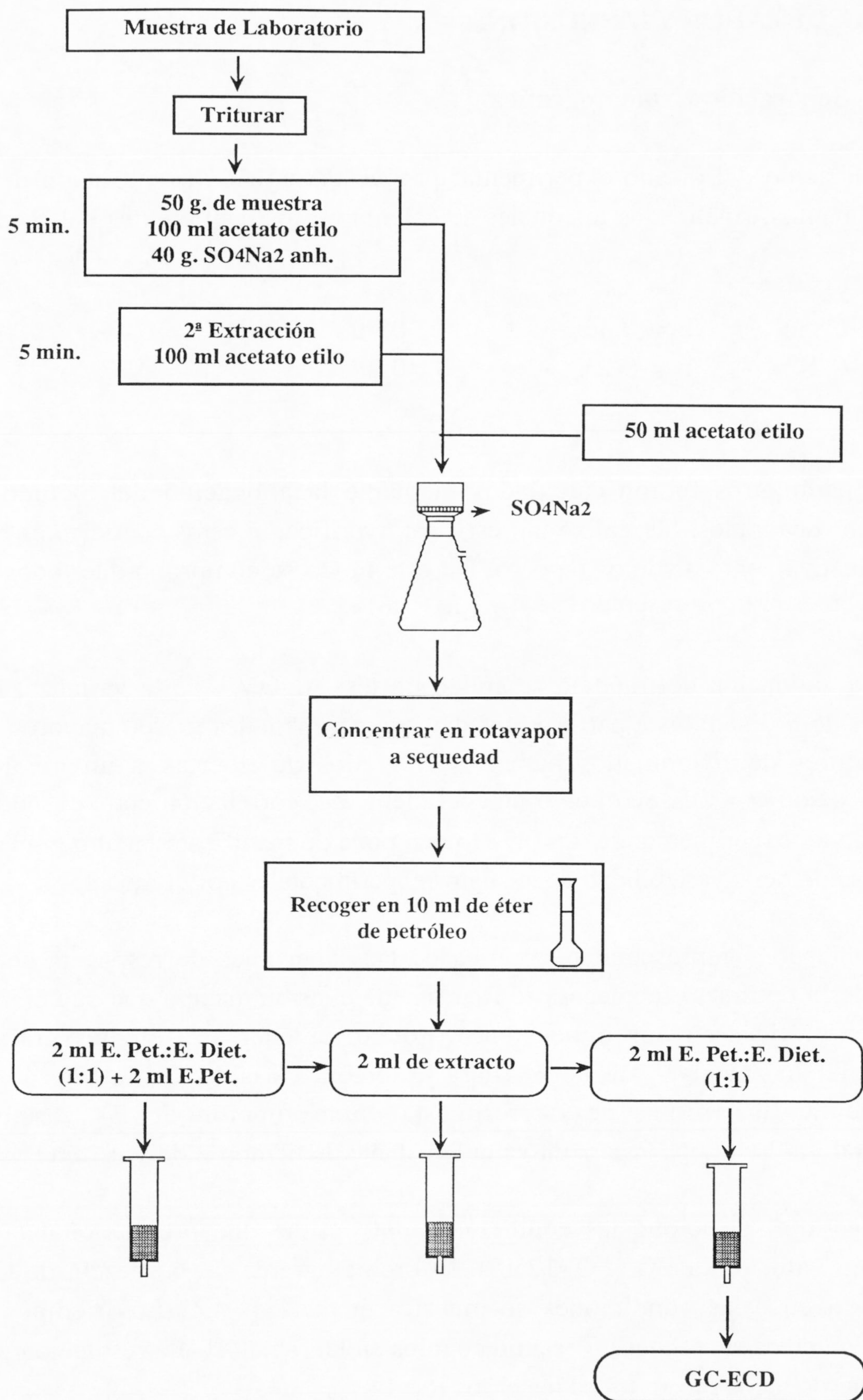


Figura 4.2- Esquema del método de extracción aplicado a plaguicidas OCs.



### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSION.

#### 4.3.1.- Separación Cromatográfica.

La aplicación del diseño experimental propuesto sugirió la realización de 20 experimentos, finalizados los cuales se calcularon los coeficientes del modelo (Eq 4.2) :

$$\begin{array}{llll}
 b_0= 11.56 & b_1=-0.46 & b_2=0.79 & b_3=-0.49 \\
 b_4=-0.24 & b_5=-0.23 & b_6=0.24 & b_7= 0.27 \\
 b_8= 0.31 & b_9= 0.22 & & 
 \end{array}$$

Estos parámetros fueron calculados mediante la aplicación del método de mínimos cuadrados. Se realizó un test-t para verificar si estos coeficientes eran significativamente distintos de cero. De este modo se comprobó que todos los coeficientes eran representativos ( $t_{\text{Student}} \geq 1.8$ )

Para la validación del modelo se aplicó un test ANOVA de la varianza. Los valores de F obtenidos a partir de los datos experimentales fueron mayores que los valores de F tabulados para 3 y 6 grados de libertad a un nivel de significación  $\alpha=0.05$ . Se obtuvo un coeficiente de correlación entre el modelo teórico y el experimental de  $R^2=0.91$  lo que pone de manifiesto un alto grado de explicación de la variabilidad de los datos experimentales por el modelo.

Para obtener la representación gráfica de las superficies de respuesta de las variables a optimizar fue necesario fijar una de ellas de manera que pudiéramos obtener gráficas en dos dimensiones. Podían obtenerse diferentes gráficas dependiendo del nivel al que se fijara la tercera variable. En la Fig. 4.3 se representan las curvas de isorrespuesta como función de las variables temperatura-2 y rampa-2 para un valor constante de tiempo-2 de seis minutos.

El programa seleccionó las condiciones del óptimo que proporcionaban un máximo valor de la FO (FO=12.18). El cromatograma de la mezcla de OCs obtenido en estas condiciones se muestra en la Fig. 4.4. Los tiempos de retención de cada compuesto están recogidos en la Tabla 4.1. La resolución para cada par de picos fue en todos los casos  $R_s > 1$ .



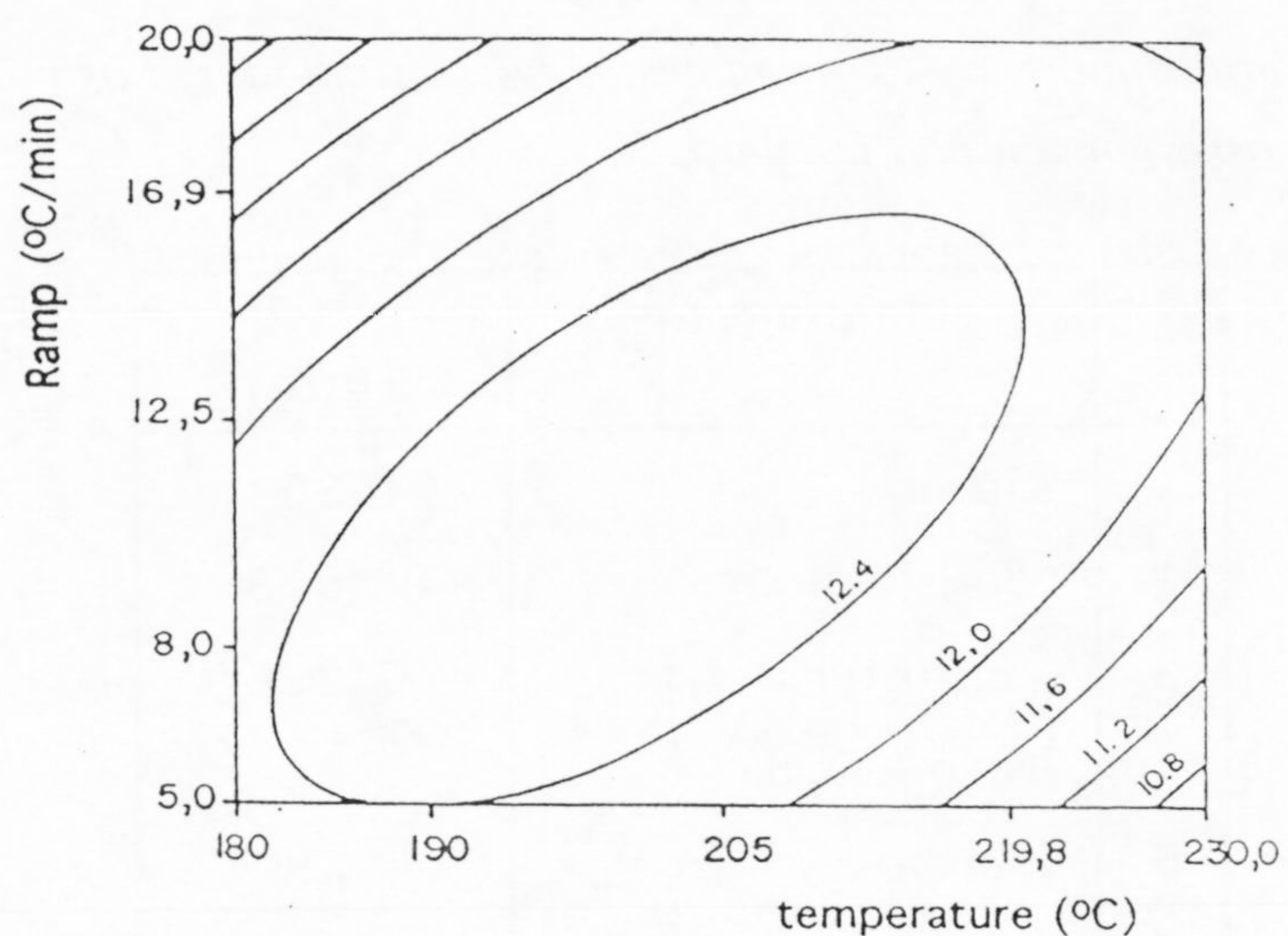


Figura 4.3.- Curvas de isorrespuesta ( $FO=10.8, 11.2, 11.6, 12.0, 12.4$ ) obtenidas de la Eq 4.2 para un valor constante de tiempo-2 de 6 minutos.

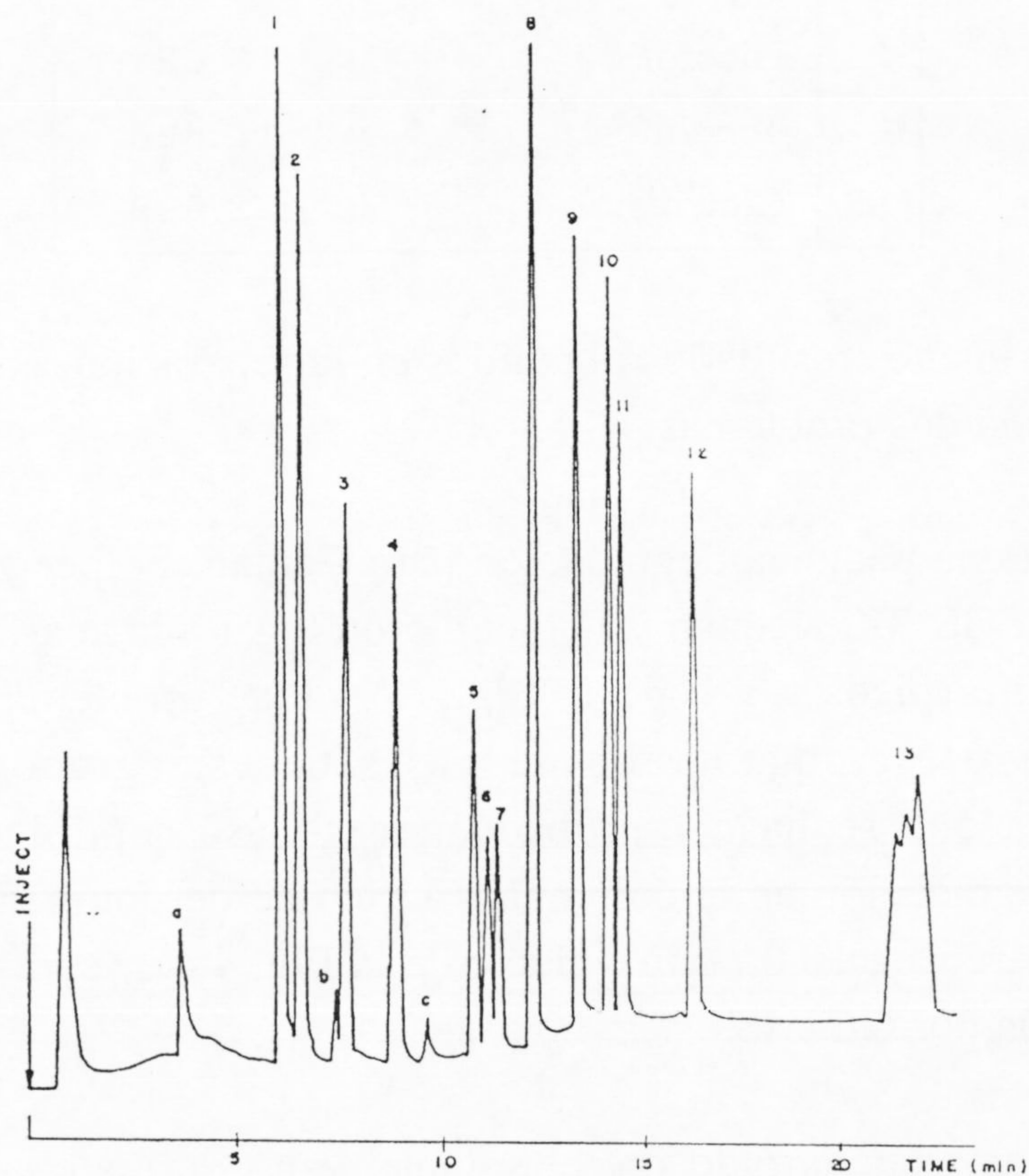


Figura 4.4.-Cromatograma GC-ECD de la mezcla de OCs de concentración 1.0-1.5 mg/L. El nº sobre los picos corresponde al nº de los compuestos en la Tabla 4.1.



TABLA 4.1

Tiempos de retención absolutos de los compuestos OCs estudiados. Los números asignados a cada plaguicida corresponden con los de la Fig. 4.4.

Nº	Compuesto	Tr (min)
1	Lindano	6.351
2	Clortalonil	6.823
3	Vinclozolina	7.996
4	Diclofluanida	9.242
5	Captan	11.233
6	Folpet	11.564
7	Procimidona	11.841
8	$\alpha$ -Endosulfan	12.748
9	$\beta$ -Endosulfan	13.845
10	Endosulfan sulfato	14.695
11	Dicofol	15.021
12	Tetradifon	16.823
13	Cipermetrin	22.099

A pesar de los buenos resultados obtenidos en la separación, en este estudio nos encontramos con dos problemas:

1.- Se observó una pequeña degradación para Captan, Folpet y Dicofol que fue confirmada por GS-MS. Captan y Folpet dieron lugar a la aparición de dos picos a 3.8 y 7.7 min. (picos a y b de la Fig. 4.4). Este problema es común en la determinación por cromatografía de gases de este grupo de compuestos (ftalimidas) ya que se ha comprobado que son susceptibles a procesos de adsorción y degradación en la columna. El pico de descomposición procedente del Dicofol aparecía a 10.01 min. (pico c de la Fig. 4.4) y su estructura también fue comprobada por GC-MS.

2.- Otro problema encontrado fue el solapamiento de los cuatro isómeros del Cipermetrin (cis A, trans C, cis B y tras D), típico de la determinación de este piretroide. Ante la imposibilidad de separar los picos con esta columna la



cuantificación de este pesticida fue llevada a cabo mediante la consideración de un pico único calculado como suma de los cuatro picos. Es posible la separación de los cuatro isómeros utilizando columnas capilares.

Este método nos permitió realizar los análisis en un tiempo total de 23 minutos más 5 minutos de equilibración en las condiciones iniciales, lo que supone la posibilidad de analizar 51 muestras diarias. El tiempo de análisis es de gran importancia cuando se trata de laboratorios de control debido a las características perecederas de los productos a los que se aplica.

#### 4.3.2.- Confirmación por GC-MS.

Se analizaron por GC-MS soluciones conteniendo los compuestos de interés. En la Tabla 4.2 se recogen los principales fragmentos obtenidos y su abundancia relativa. Estos datos coinciden con los descritos en bibliografía para estos pesticidas (6,8,10-12).

Con el fin de detectar los posibles procesos de descomposición que pudieran tener lugar durante el análisis cromatográfico debido a la facilidad de degradación que presentan compuestos como Captan y Folpet, se prepararon disoluciones de 50 mg/L de tales compuestos que se analizaron, separadamente, en idénticas condiciones pero variando la temperatura de inyector (150, 200 y 250 °C).

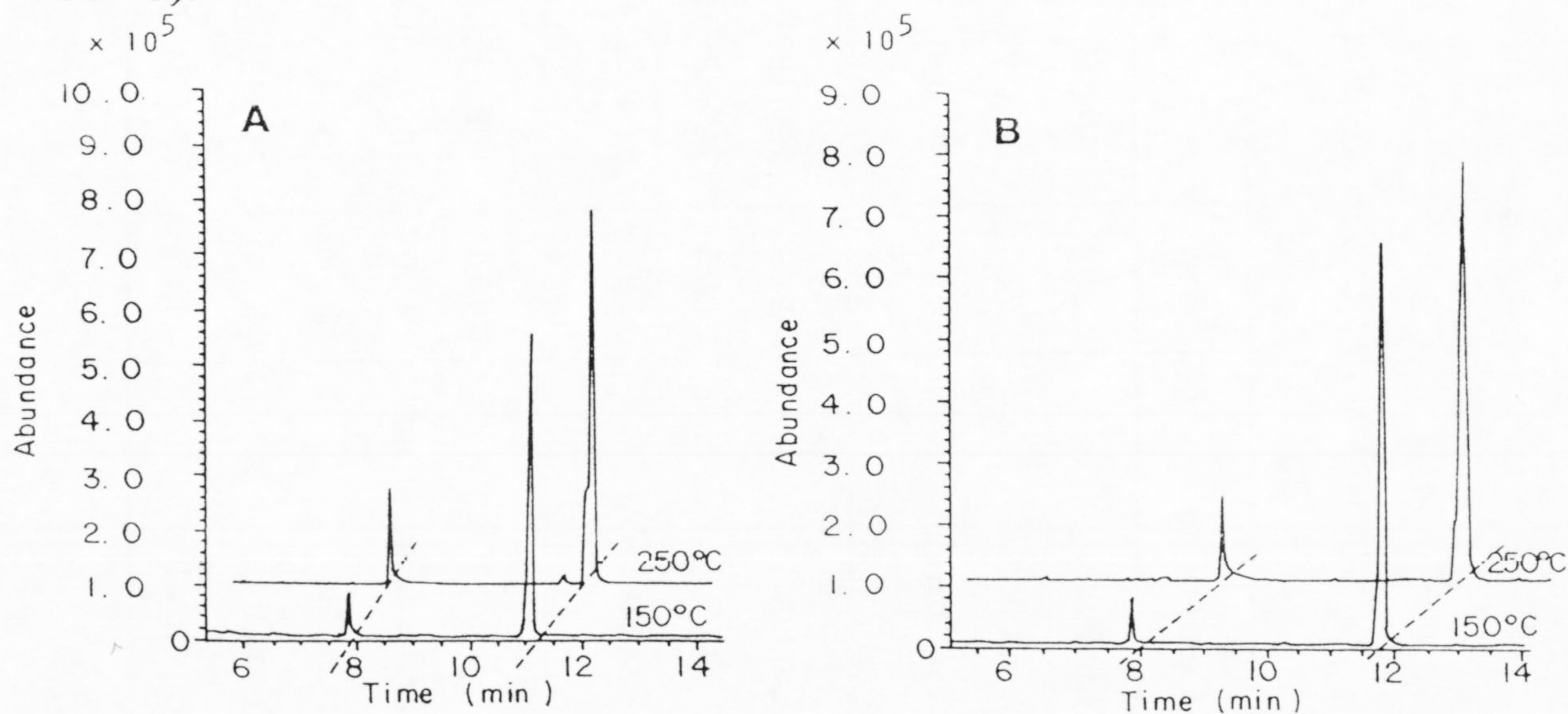


Figura 4.5- Cromatograma GC-MS de (A) Captan y (B) Folpet (50 mg/L) a diferentes temperaturas de inyector: 150°C y 250°C.



TABLA 4.2

*Principales iones y abundancias relativas del espectro de masas de los pesticidas organoclorados estudiados*

Compuesto	Pm	Principales iones [m/z (abundancia relativa, %)]
Lindano	288	77 (25), 111(66), 147 (29), 183 (100), 219 (66), 254 (19)
Clortalonil	264	98 (19), 109 (30), 124 (24), 133 (22), 266 (100)
Vinclozolina	285	97 (31), 124 (95), 178 (86), 198 (80), 212 (100), 285 (61)
Diclofluanida	332	77 (18), 92 (20), 123 (100), 167 (32), 224 (26)
Captan	299	79 (100), 117 (12), 149 (28), 264 (8)
Folpet	295	76 (68), 104 (100), 130 (80), 260 (94), 295 (20)
Procimidona	283	67 (53), 96 (100), 186 (8), 255 (9), 283 (19)
$\alpha$ -Endosulfan	404	109 (69), 121 (68), 160 (79), 195 (99), 237 (100), 265 (52), 339 (21)
$\beta$ -Endosulfan	404	109 (32), 120 (50), 160 (91), 195 (100), 237 (96), 267 (47), 339 (30)
Endosulfan sulfato	420	109 (18), 121(26), 170 (34), 237 (58), 272 (100), 387 (24)
Dicofol	368	75 (41), 111 (42), 139 (100), 250 (16)
Tetradifon	354	75 (78), 111 (100), 159 (89), 229 (43), 356 (32)
Cipermetrin	415	77 (31), 91 (39), 127 (32), 163 (100), 181 (89), 209 (29), 415 (3)



Nos aseguramos en todos los casos una buena limpieza del inserto del inyector. Observamos que el pico de 7.7 minutos aparecía siempre y que era dependiente de la temperatura como se aprecia en la Fig. 4.5. Debido a los requerimientos de sensibilidad de estos compuestos, la temperatura de inyector seleccionada fue 240 °C.

Los espectros de masas de los productos de degradación de Captan y Folpet se muestran en las Fig. 4.6 y 4.7. Los espectros de masas 1 y 3 correspondientes a los picos obtenidos a 3.8 y 3.7 min durante el análisis de estos compuestos, presentan los mismos tres iones principales; m/z 43, m/z 59 y m/z 101. El espectro nº 2 correspondiente al pico de 7.7 min obtenido con el análisis de Captan, contiene los fragmentos de m/z 79 (100%), m/z 123 (9%) y m/z 151 (50%) que pueden asignarse a la degradación de Captan en tetrahydroftalimida de acuerdo con los patrones de fragmentación indicados en la Fig. 4.6. El espectro de masas nº 4 del pico a 7.7 min aparecido en el análisis de Folpet, contiene los fragmentos iónicos de m/z 76 (90%), m/z 104 (75%) y m/z 147 (100%) y se pueden asignar a la descomposición de Folpet en ftalimida de acuerdo con el patrón de fragmentación de la Fig.4.7.

De este modo, podemos esperar picos a 3.8 y 7.7 procedentes de productos de degradación de Captan y Folpet en las condiciones cromatográficas seleccionadas.

También se estudió el espectro de masas del pico correspondiente a la degradación del Dicofol, que fue identificado como 2-Clorobenzofenona por la librería de espectros consultada. La diferencia entre los espectros de masas de estos dos picos estriba en que en el caso del Dicofol aparece un ión a m/z 251, correspondiente a la pérdida  $[M - CCl_3]^+$  y la 2-Clorobenzofenona da un ión a m/z 250.



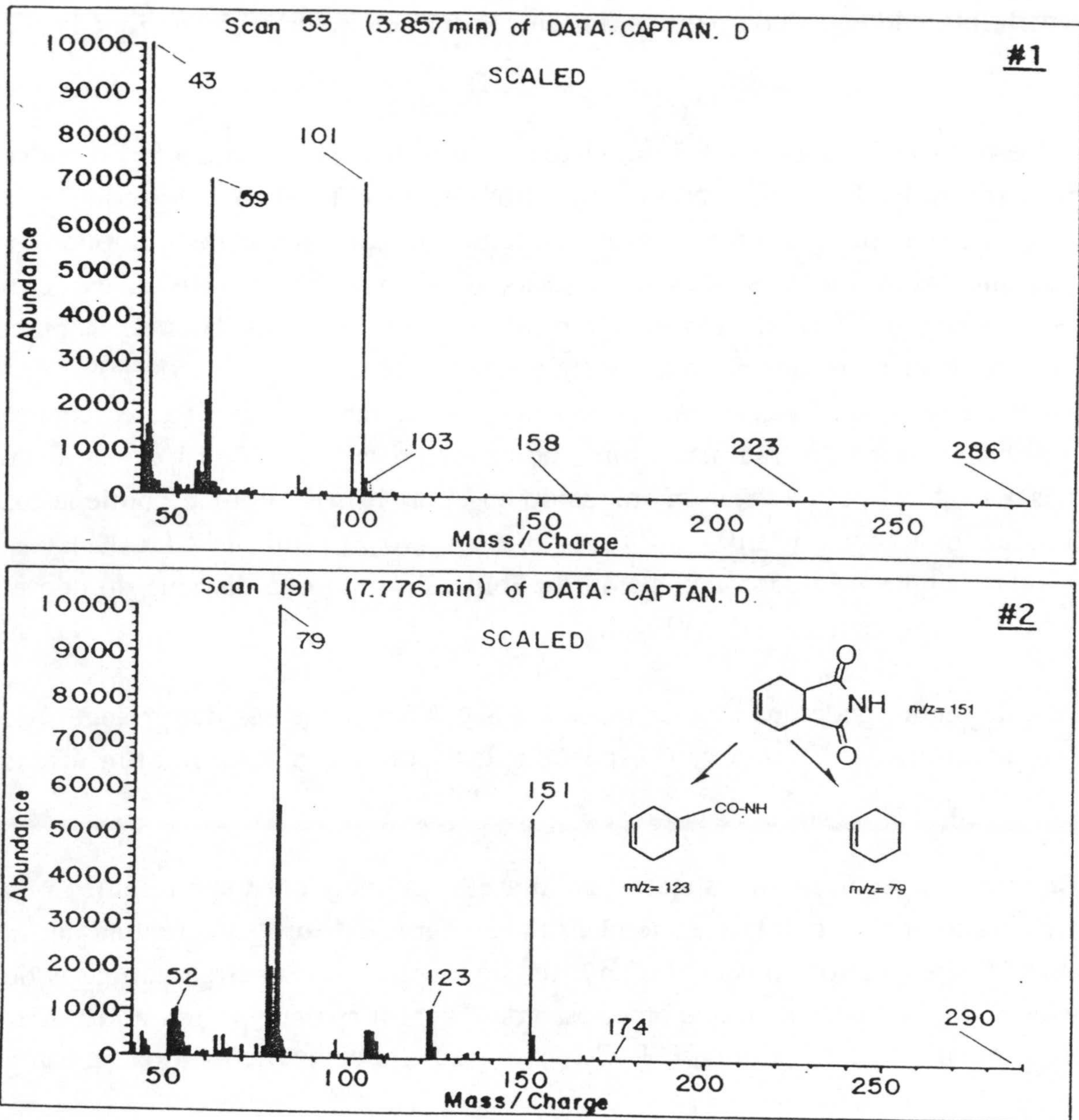


Figura 4.6.- Espectro de masas de los productos de degradación de Captan aparecidos a 3.8 y 7.7.



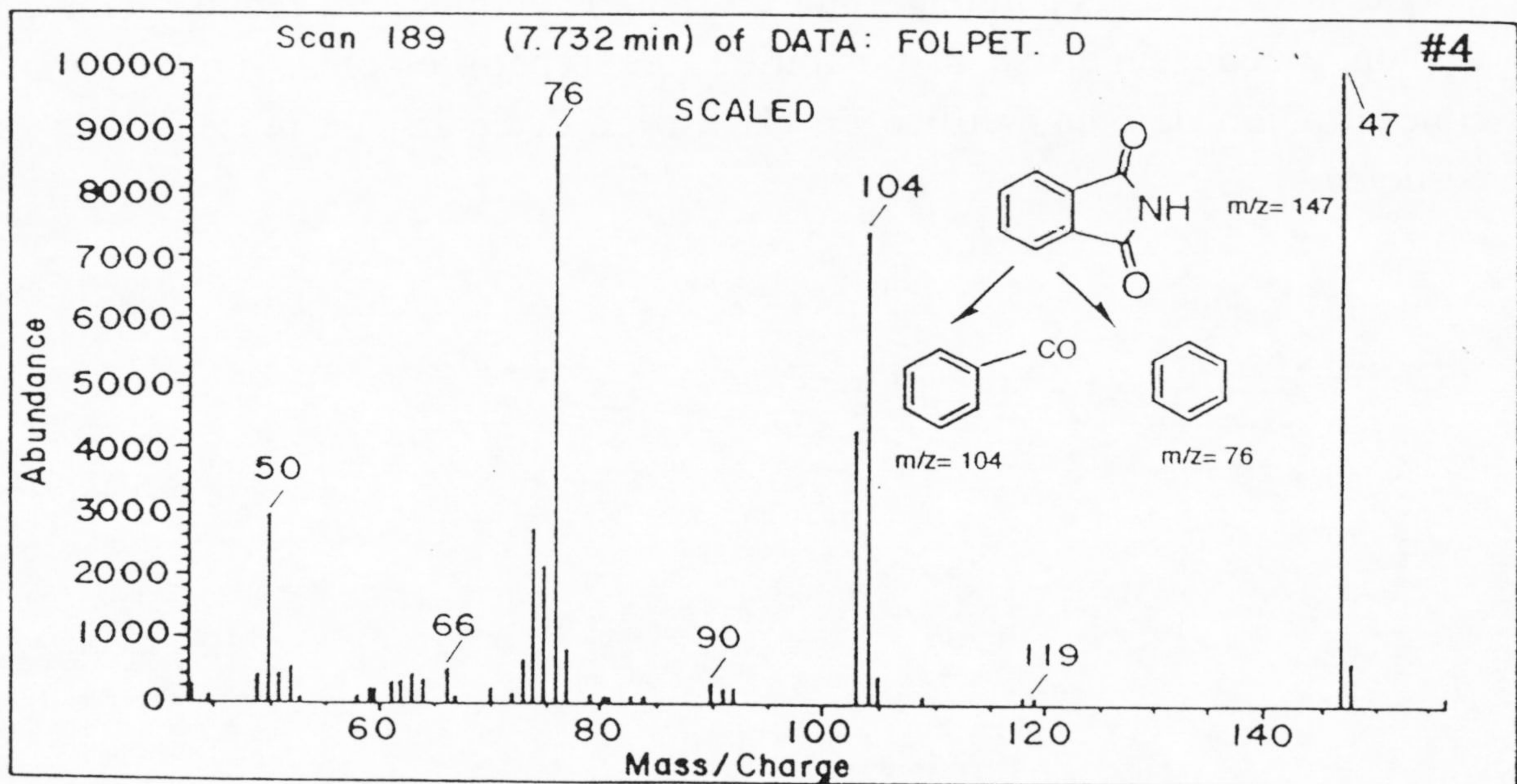
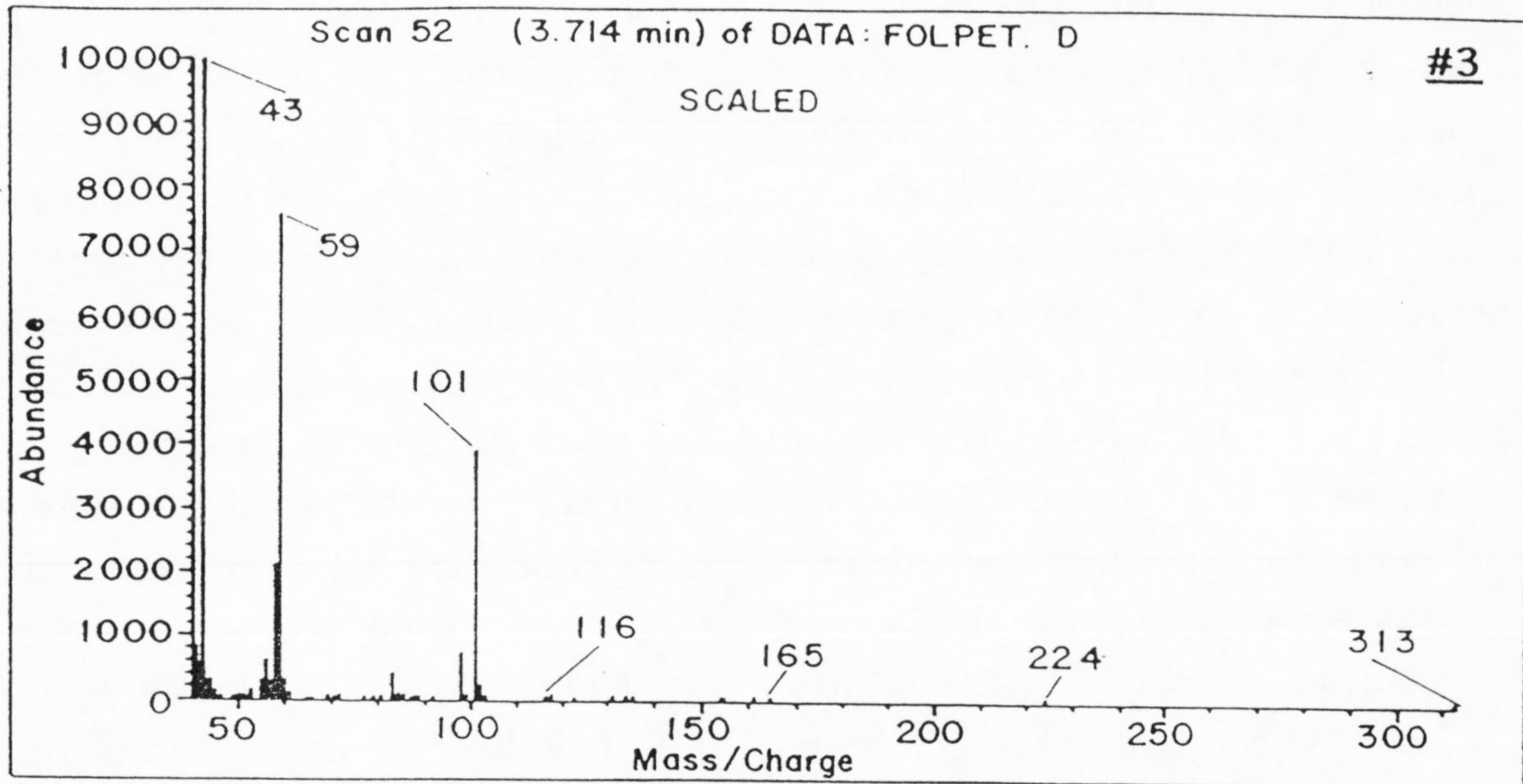
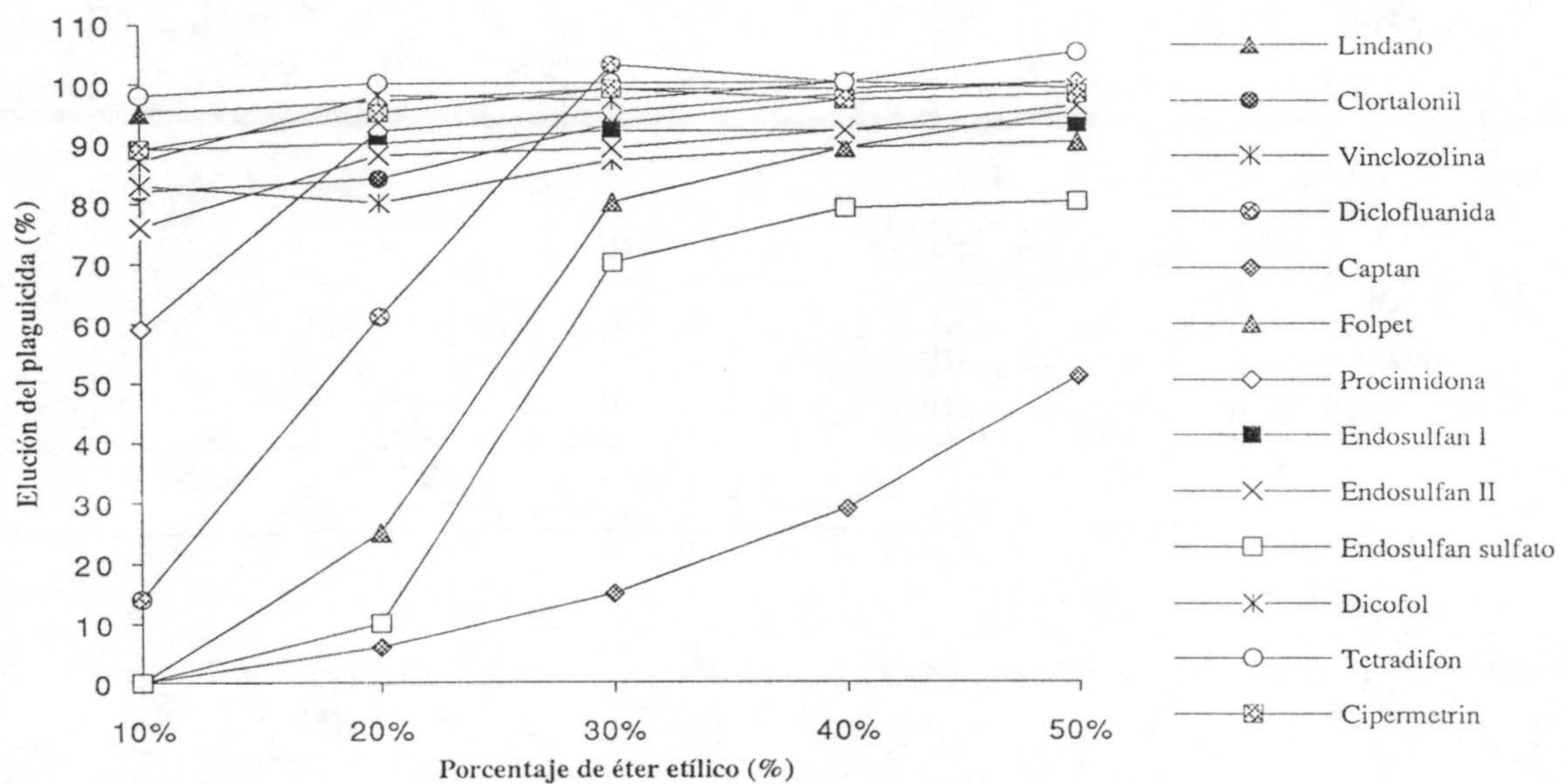


Figura 4.7.- Espectro de masas de los productos de degradación de Folpet aparecidos a 3.7 y 7.7.



### 4.3.3.- Estudio de clean up.

Se realizaron pruebas de clean up eluyendo con fracciones de 2 mL de éter dietílico en éter de petróleo a diferentes proporciones, que fueron recogidas y analizadas off-line por GC. Los gráficos de elución obtenidos con los diferentes porcentajes de éter dietílico utilizados (10%, 20%, 30% y 50%) se representan en la Fig. 4.8. En ella se puede apreciar que todos los pesticidas estudiados, excepto Captan, eluyen en los primeros 2 mL con el porcentaje de éter dietílico del 50%, que fue el seleccionado. Para completar la elución de Captan en los primeros 2 mL, la fracción de éter dietílico en el eluyente ha de ser mayor, de hasta un 70%, lo que conlleva un aumento en la concentración de interferentes en el eluato y, por tanto, una disminución en la eficacia del clean up. También podría llevarse a cabo la elución con 3 mL pero esto supondría una dilución de la muestra acompañado de una mayor suciedad del extracto. Al tratarse de un método de rutina es aconsejable que sea lo más limpio posible con el fin de alargar la vida de las columnas aún a expensas de una peor recuperación para Captan. Puede sugerirse la posibilidad de repetir el clean up con mayor concentración de éter dietílico en el caso de detectarse la presencia de este pesticida.



**Figura 4.8.-** Gráfico de elución de los diferentes pesticidas OCs en cartuchos de sílica, utilizando diferentes porcentajes de éter dietílico en el eluyente.

La reproducibilidad del proceso se optimizó a un flujo de elución de 1-2 mL/min.



La efectividad de la limpieza del extracto proporcionada por el método puede apreciarse en la Fig. 4.9 en donde se puede ver el cromatograma de una muestra de pimiento verde fortificada con la mezcla de pesticidas estudiados y extraída con el método propuesto, antes (A) y después (B) del proceso de clean up.



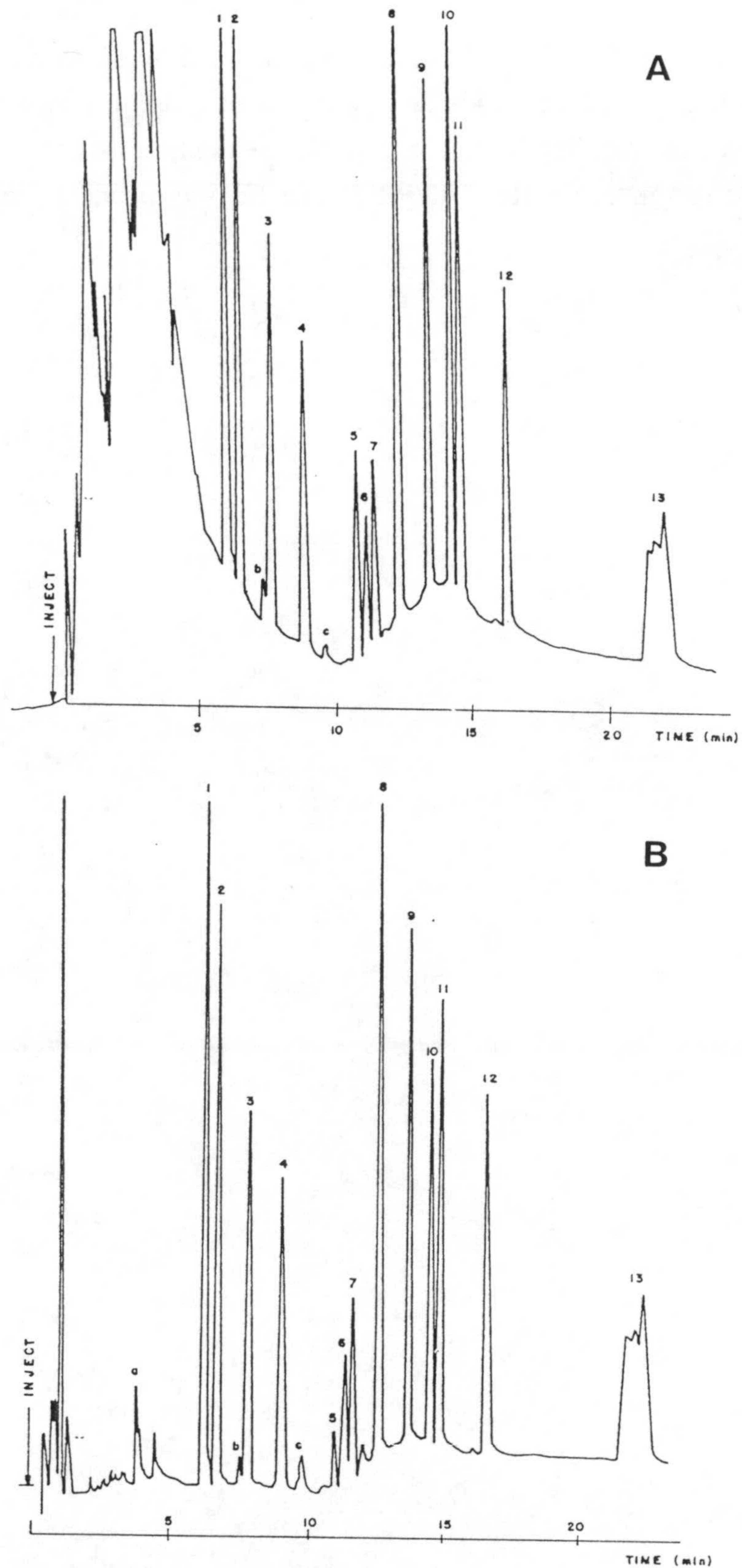


Figura 4.9.-Cromatograma GC-ECD correspondiente a una muestra de pimiento contaminada con la mezcla de OCs (0.20-0.30 mg/kg) y analizada por el método propuesto (A) sin clean-up y (B) con clean-up en columnas de sílica.



## 4.3.4.- Validación del método.

Se estudió la *precisión* para los tiempos de retención y las alturas de pico. En la Tabla 4.3 se recogen los datos de precisión en un mismo día (repetitividad) y en días diferentes (reproducibilidad), expresados en términos de coeficientes de variación. Se aprecia, como es habitual, que los coeficientes de variación son mayores para la reproducibilidad que para la repetitividad, oscilando entre 2.9-7.5% para las alturas de pico y 0.12-0.62% para los TR.

TABLA 4.3

*Estudio de la precisión del método. Cálculo de la repetitividad y reproducibilidad, expresadas en términos de coeficientes de variación (%), de los tiempos de retención y alturas de pico de los OCs estudiados.*

Compuesto	Repetitividad CV(%)		Reproducibilidad CV(%)	
	TR	Altura de pico	TR	Altura de pico
Lindano	0,30	3,8	0,57	4,2
Clortalonil	0,31	4,3	0,62	5,5
Vinclozolina	0,31	3,2	0,61	3,9
Diclofluanida	0,20	2,9	0,62	3,5
Captan	0,27	4,8	0,49	6,3
Folpet	0,20	5,9	0,41	6,0
Procimidona	0,18	5,2	0,39	5,6
$\alpha$ -Endosulfan	0,27	2,9	0,31	5,1
$\beta$ -Endosulfan	0,23	3,6	0,23	5,9
Endosulfan sulfato	0,12	3,4	0,25	4,8
Dicofol	0,48	6,6	0,61	6,6
Tetradifon	0,29	4,8	0,31	5,5
Cipermetrin	0,35	7,5	0,33	7,3

Se observó que para el caso de picos cuya resolución no es completa (Captan, Folpet, Procimidona) la precisión en alturas era mayor trazando la línea de base por los puntos de base-base, en vez de por los de valle-valle.



En el caso del Cipermetrin la cuantificación de los picos en área era más repetitiva que en altura y ante la imposibilidad de separación de los cuatro isómeros se consideró en todo caso como un único pico cuantificado como suma. El trazado de la línea de base se hizo en modo horizontal.

Los coeficientes de variación, tanto de tiempos de retención como de alturas, fueron en general aceptables.

*Linealidad.* Se estudió el rango dinámico lineal del detector entre 0.05 y 5.00 ng, cantidad absoluta inyectada, excepto para Captan, Folpet y Procimidona para los que fue algo menor, entre 0.20 y 5.00 ng. Ver Tabla 4.4. Los coeficientes de correlación fueron buenos en todos los casos (mayores de 0.999). Para Captan (0.991) y Folpet (0.989) se obtuvo una peor correlación, probablemente debido a los procesos de descomposición anteriormente mencionados.

*Límite de detección y límite práctico de determinación.* El límite de detección se basó en una relación señal/ruido de 3. Los valores obtenidos, ver Tabla 4.4, fueron del orden de 10 pg (0.002 mg/kg) excepto para Captan, Folpet y Procimidona que fue de aproximadamente 40 pg (0.008 mg/kg).

El límite práctico de determinación fue del orden de 50 pg (0.01 mg/kg). Para Captan, Folpet y Procimidona resultó ser algo superior, del orden de 200 pg (0.04 mg/kg). En todos los casos fue suficiente para los requerimientos fijados por los LMRs de la mayoría de los países en los productos estudiados.



TABLA 4.4

Rango lineal, coeficiente de correlación, límite de detección y límite de cuantificación de los OCs estudiados.

Compuesto	Rango lineal (ng)	r	L.D. (mg/kg)	L.C. (mg/kg)
Lindano	0,05-5,00	0,9993	0,0016	0,01
Clortalonil	0,05-5,00	0,9991	0,0023	0,01
Vinclozolina	0,05-5,00	0,9990	0,0016	0,01
Diclofluanida	0,05-5,00	0,9997	0,0015	0,01
Captan	0,20-5,00	0,9910	0,0083	0,04
Folpet	0,20-5,00	0,9890	0,0079	0,04
Procimidona	0,20-5,00	0,9993	0,0078	0,04
$\alpha$ -Endosulfan	0,05-5,00	0,9990	0,0017	0,01
$\beta$ -Endosulfan	0,05-5,00	0,9992	0,0021	0,01
Endosulfan sulfato	0,05-5,00	0,9998	0,0015	0,01
Dicofol	0,05-5,00	0,9999	0,0026	0,01
Tetradifon	0,05-5,00	0,9990	0,0025	0,01
Cipermetrin	0,05-5,00	0,9990	0,0016	0,01

*Estudios de recuperación.* Las recuperaciones obtenidas para muestras de pimiento con la aplicación del método completo (extracción + clean up) son las que aparecen en la Tabla 4.5. El Nivel-1 corresponde a una concentración de entre 0.03 y 0.05 mg/kg, próxima al límite de determinación, y el Nivel-2 entre 0.20 y 0.30 mg/kg. Las recuperaciones de los diferentes pesticidas oscilaron entre el 73-106% excepto para Captan -51%-. Los coeficientes de variación fueron inferiores al 17% en todos los casos excepto para Captan. (CV>20%) lo que es corriente ya que es conocido que tanto Captan como Folpet son compuestos particularmente susceptibles de respuestas cromatográficas inconsistentes (39). Este hecho se puede explicar por la falta de reproducibilidad del proceso de clean up y por su probada descomposición en el proceso analítico.



TABLA 4.5

*Recuperaciones medias (n=5) y coeficientes de variación obtenidos en muestras de pimiento contaminadas a dos niveles de contaminación (0.03-0.05 y 0.20-0.30 mg/kg).*

Compuesto	Nivel-1 (0,03-0,05 mg/kg)		Nivel-2 (0,20-0,30 mg/kg)	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Lindano	95	5,3	97	4,9
Clortalonil	91	9,3	95	9,5
Vinclozolina	97	5,4	100	4,4
Diclofluanida	99	3,2	105	3,5
Captan	55	21,7	51	20,4
Folpet	105	15,8	106	16,0
Procimidona	98	11,3	100	12,5
$\alpha$ -Endosulfan	90	4,9	92	5,2
$\beta$ -Endosulfan	89	8,5	89	6,3
Endosulfan sulfato	81	9,9	79	10,6
Dicofol	70	16,3	73	15,8
Tetradifon	95	13,9	105	14,5
Cipermetrin	93	17,3	98	16,2



*Especificidad y efecto matriz.* El método de análisis propuesto se aplicó en muestras de pepino, judías y melón, procedentes de invernaderos de la provincia de Almería, a fin de observar el efecto de la matriz en las recuperaciones y la resolución así como estudiar la presencia de picos interferentes.

Las muestras homogeneizadas fueron contaminadas con los trece pesticidas en el rango de 0.20-0.30 mg/kg. Los análisis se hicieron por duplicado (en este estudio se incluyen también las muestras de pimiento). Se realizaron también blancos de cada matriz, observándose en todos los casos que no aparecían picos que interfirieran con los pesticidas estudiados. Los extractos eran siempre limpios y los compuestos en las muestras contaminadas se identificaron correctamente.

Las recuperaciones, como era de esperar, dependían de la matriz, si bien en un margen aceptable (Fig. 4.10). Los datos de recuperación oscilaban entre el 87-114% en todos los casos excepto para Captan, Endosulfan sulfato y Dicofol que fue de 44-80%.

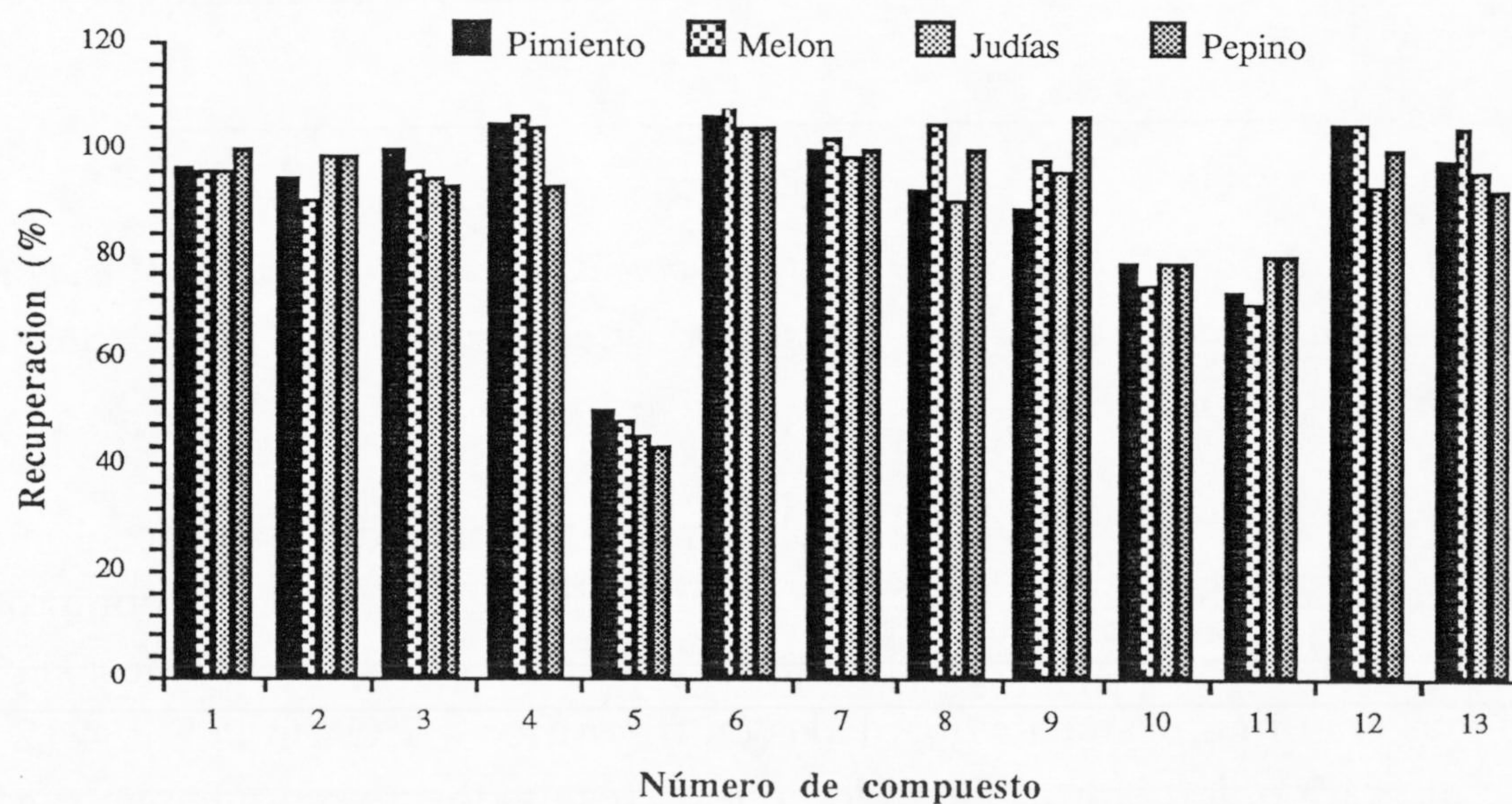


Figura 4.10.- Recuperaciones medias ( $n=2$ ) de los OCs estudiados en diferentes matrices, Nivel de contaminación 0.20-0.30 mg/kg.



#### 4.3.5.- Control de calidad en análisis de rutina.

Al igual que en el caso de los pesticidas OPs (ver capítulo 3.3.5.) se pusieron en práctica una serie de medidas de control de calidad durante la aplicación del método en muestras reales en la campaña 93/94. En este caso también se llevaron a cabo análisis de muestras de control fortificadas con los pesticidas estudiados, recogiendo los resultados en cartas de control. Los residuos se mostraron estables en todos los casos durante el periodo en el que se llevaron a cabo los análisis (dos meses). En la Fig. 4.11 se representa el gráfico obtenido para Vinclozolina.

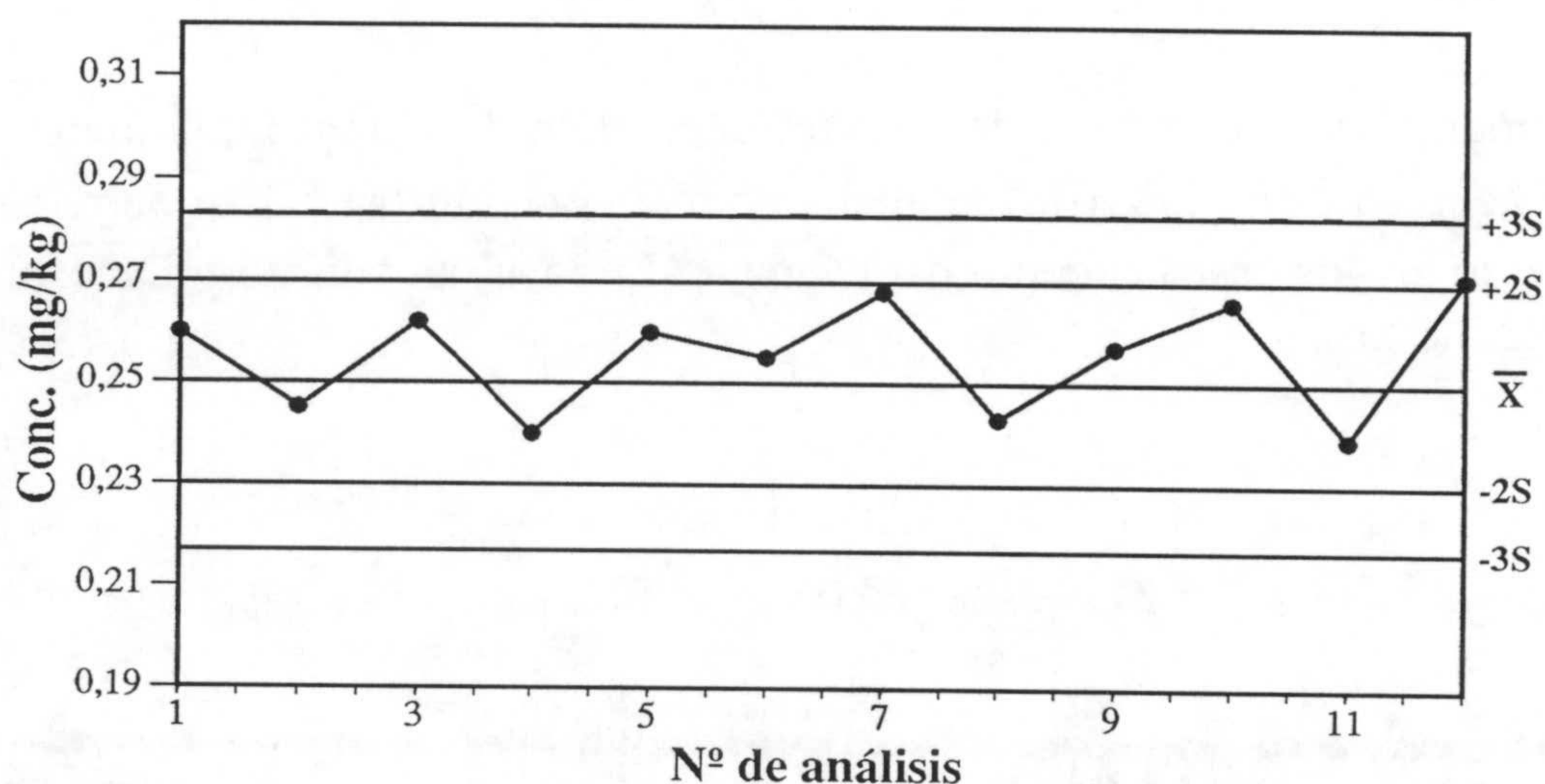


Figura 4.11.- Gráfico de control según Shewhart obtenido para Vinclozolina en muestras de control contaminadas y analizadas durante un periodo de dos meses. Los análisis se realizaron cada cinco días.

También se realizaron cartas de control para los patrones de cuantificación de las muestras, de la forma descrita en el capítulo 3.3.5. En este caso se comprobó la buena estabilidad de los pesticidas OCs durante más de un mes si las soluciones eran rigurosamente guardadas en frigorífico a 7°C. En la Fig. 4.12 se recoge el gráfico de control obtenido con los resultados, expresados en mg/L, obtenidos con la inyección diaria de la mezcla de patrones de trabajo para el caso del Lindano. Ninguno de los valores obtenidos sobrepasaba los límites permitidos.



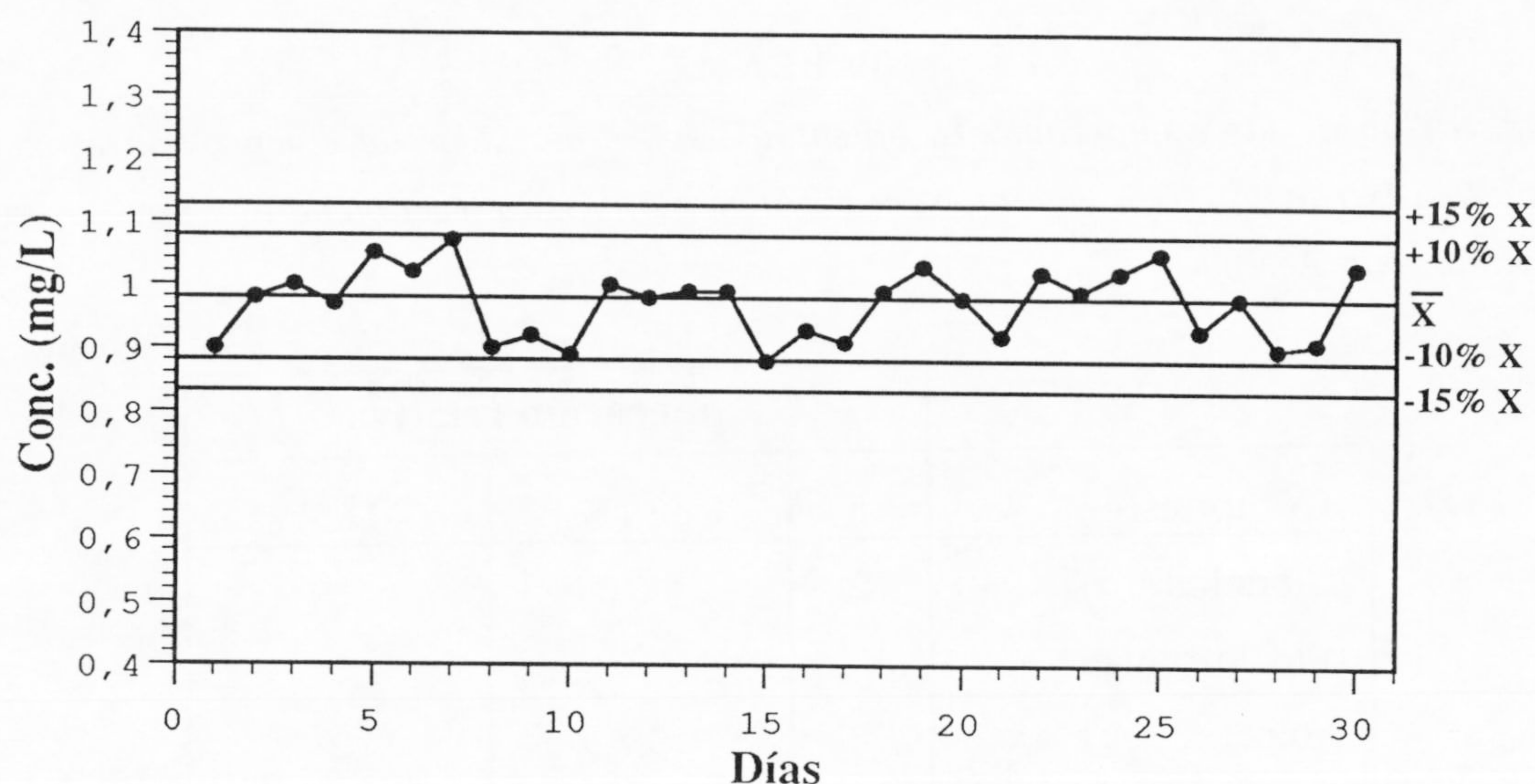


Figura 4.12.- Gráfico de control según Shewhart obtenido para Lindano en el control diario de la disolución mezcla de patrones de trabajo durante 30 días.

Otro modo de evaluar el método, para el caso de pesticidas OCs consistió en la comparación con un método de probada eficacia como el recomendado por la AOAC (40), que ha venido aplicándose en nuestro laboratorio durante años. Este es un buen modo de evaluar un nuevo método en muestras de campo ya que no existen muestras de referencia certificadas que nos permitan comprobar la exactitud de nuestro método y solo podemos disponer de muestras contaminadas por nosotros que suponemos tienen un comportamiento similar a las muestras reales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.6, en donde se representa la recuperación relativa de los dos métodos aplicados sobre muestras reales. La recuperación relativa se calculó como:

$$\text{Recuperación relativa} = \frac{\text{Rec. con el método estudiado} \times 100}{\text{Rec. con el método de la AOAC}}$$



TABLA 4.6

Comparación de las recuperaciones obtenidas, sobre muestras de campo, con el método estudiado (extracción con acetato de etilo) y el método recomendado por la AOAC (extracción con AcN).

Compuesto	Recuperación relativa		
	n	Rec (%)	D.S.
Clortalonil	2	130	5
Vinclozolina	3	92	5
Folpet	2	97	2
Procimidona	4	95	11
$\alpha$ -Endosulfan	10	97	8
$\beta$ -Endosulfan	10	100	13
Endosulfan sulfato	9	90	20
Dicofol	2	108	18
Tetradifon	2	116	7
Cipermetrin	2	96	10

#### 4.3.6.- Aplicación del método en la campaña 93/94.

En nuestro laboratorio, se han analizado durante años residuos de OCs y piretroides en frutas y hortalizas aplicando el método recomendado por la AOAC hasta ultimar el método descrito de extracción con acetato de etilo y posterior clean up con EFS. Este último método se ha aplicado en la campaña 93/94 poniéndose de manifiesto su alta eficiencia, sensibilidad, selectividad y precisión. Se analizaron un total de 774 muestras de los productos vegetales de mayor peso específico en la exportación hortofrutícola almeriense. Más de un 70% de estas muestras fueron de pimiento debido a que, por diversos factores (incidencia de plagas, fechas de plantación, densidad del fruto, etc.) los residuos de tratamientos fitosanitarios son más frecuentes.



TABLA 4.7

*Distribución por productos de las muestras analizadas en la campaña de producción 1993/94.*

	nº muestras
Pimiento	546
Pepino	141
Tomate	41
Calabacin	26
Berenjena	20
TOTAL	774

En la Tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos durante el periodo de duración de la campaña distribuidos por productos. Según estos datos se han detectado residuos positivos en aproximadamente el 30% de las muestras analizadas. Es el Endosulfan el que aparece más frecuentemente, mientras que Lindano, Cipermetrin, Clortalonil y Diclofluanida, Procimidona y Vinclozolina se detectaron ocasionalmente.

TABLA 4.8

*Residuos de plaguicidas encontrados a diferentes niveles de concentración, distribuidos por productos, en las muestras analizadas en la campaña de producción 1993/94.*

	PIMIENTO		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)			
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Cipermetrin	546	545	1	-	-	-
Clortalonil	546	544	2	-	-	-
Diclofluanida	546	544	2	-	-	-
Endosulfan	546	310	193	36	7	-
Lindano	546	541	5	-	-	-
Procimidona	546	498	32	12	3	1
Vinclozolina	546	530	16	-	-	-



TABLA 4.8 (Cont.)

<b>PEPINO</b>		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Clortalonil	141	140	1	-	-	-
Diclofluanida	141	140	1	-	-	-
Endosulfan	141	113	27	-	-	-
Procimidona	141	129	9	3	-	-

<b>TOMATE</b>		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Cipermetrin	41	39	2	-	-	-
Clortalonil	41	39	1	1	-	-
Endosulfan	41	38	3	-	-	-
Procimidona	41	34	7	2	-	-
Vinclozolina	41	36	5	-	-	-

<b>BERENJENA</b>		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Procimidona	20	18	2	-	-	-

<b>CALABACIN</b>		NIVEL DE RESIDUO ENCONTRADO (mg/kg)				
	nº muestras	no detectado	<0,20	0,20-0,50	0,51-1,00	>1
Endosulfan	26	22	4	-	-	-
Procimidona	26	24	2	-	-	-
Vinclozolina	26	25	1	-	-	-



IV - Análisis de Organoclorados

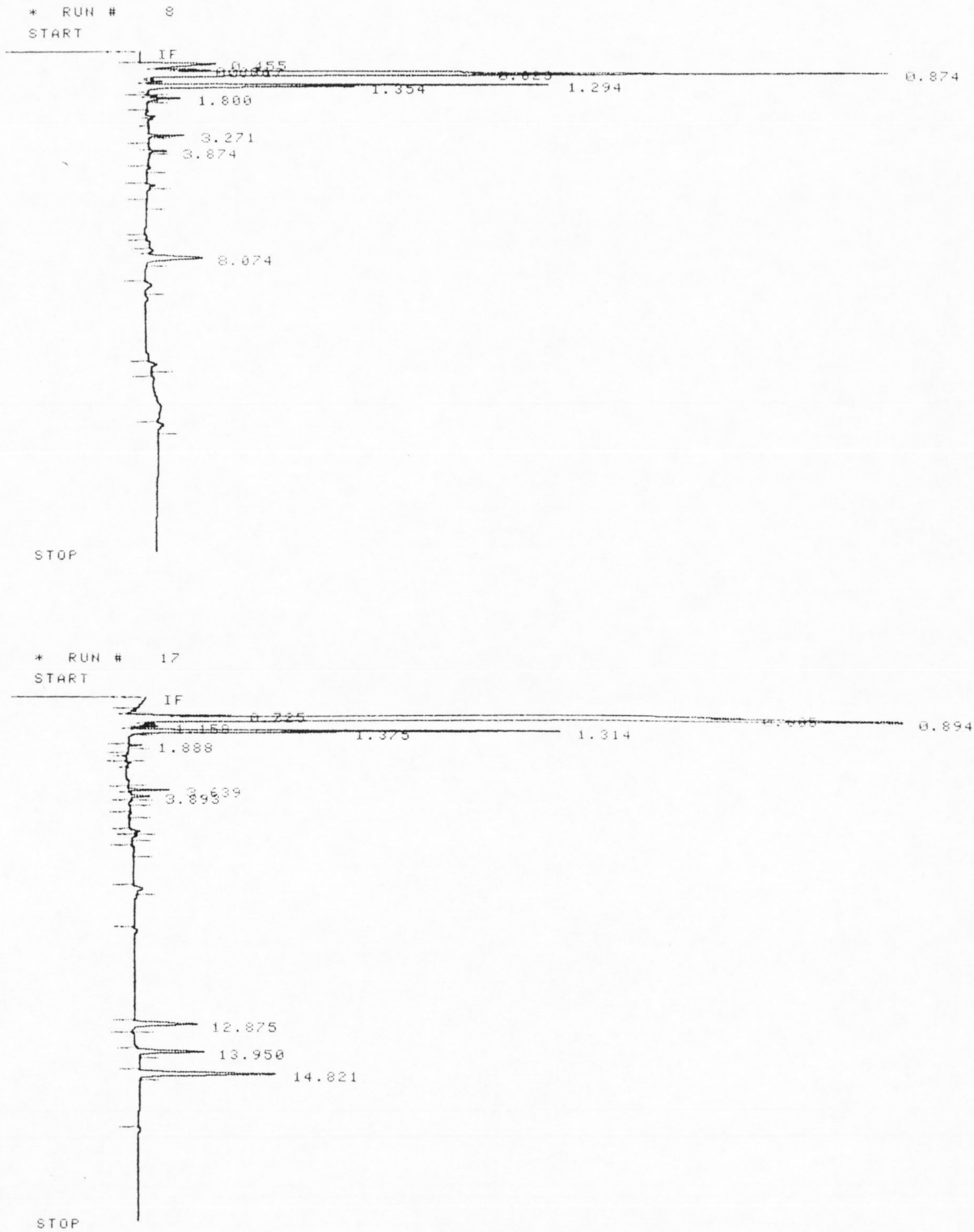
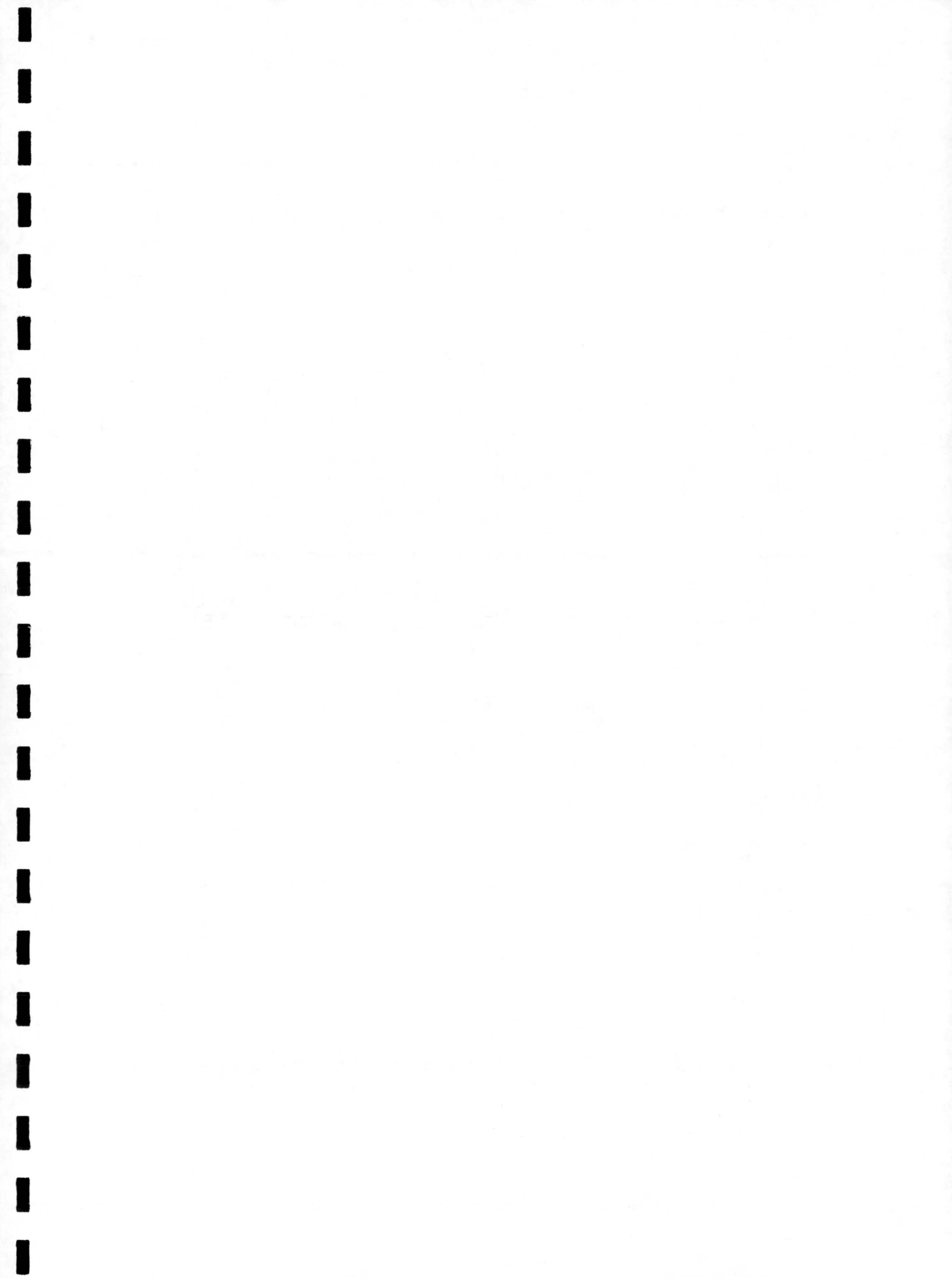
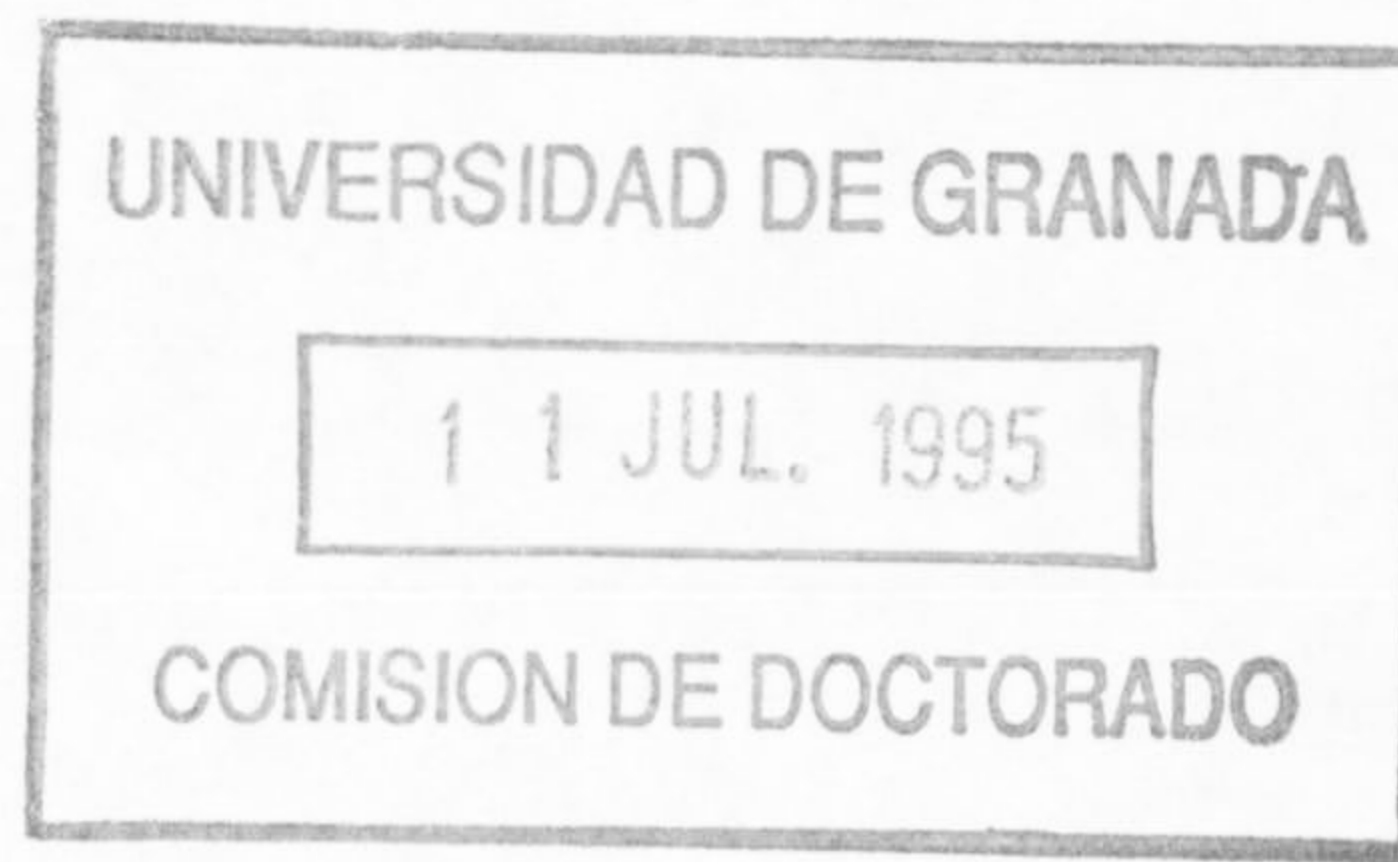


Figura 4.13.- Cromatograma GC-ECD de una muestra de pimienta analizada durante la campaña 93/94.









**CAPITULO V**

**METODO MULTIRRESIDUOS DE DETERMINACION DE  
IMIDACLOPRID Y N-METILCARBAMATOS EN MATRICES  
VEGETALES POR HPLC.**







## CAPITULO V

### METODO MULTIRRESIDUOS DE DETERMINACION DE IMIDACLOPRID Y N-METILCARBAMATOS EN MATRICES VEGETALES POR HPLC.

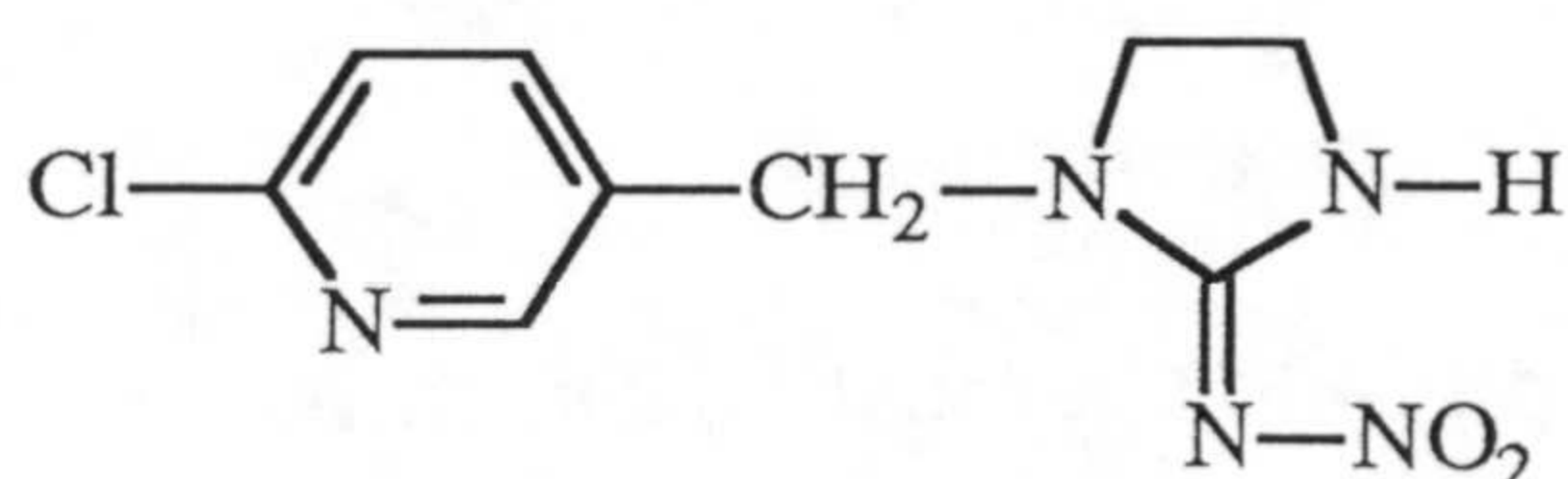
#### 5.1 INTRODUCCION.

Aunque los MMRs aplicados a pesticidas consisten generalmente en una extracción seguida de análisis por GC, en los últimos años, como alternativa en el análisis de compuestos termolábiles o para compuestos con elevado punto de ebullición, se están desarrollando nuevos métodos que incluyen el análisis mediante HPLC con diferentes detectores (UV, Fluorescencia, UV-DAD)(56). Estos métodos presentan graves inconvenientes cuando se aplican a matrices vegetales debido al gran número de coextractos que presentan y a la baja sensibilidad de los detectores, sobre todo se se trabaja con UV. Un caso significativo de estos métodos es el desarrollado para N-Metilcarbamatos (NMCs), basado en reacciones de derivatización postcolumna (58) con o-ftalaldehido (OPA) para producir un compuesto altamente fluorescente que se detecta mediante detector de fluorescencia (método EPA-505) (52,64).

No obstante, hay que considerar que en la provincia de Almería el uso de NMCs está limitado a un cierto número de ellos, sobre todo Metiocarb, que pueden también analizarse por GC con diferentes detectores, FPD o masas (80). Es por esto que en este capítulo hemos desarrollado un método aplicado al análisis de NMCs pero que nos permita el análisis de otros compuestos con diferentes grupos funcionales pero de gran interés debido a su uso y a la imposibilidad de su análisis mediante GC. Este es el caso de Imidacloprid, pesticida de reciente aparición cuyo uso se ha extendido rápidamente en los últimos años en los cultivos hortícolas de la provincia de Almería. Introducido por Bayer AG, se trata de un insecticida de acción sistémica efectivo para el control de chupadores en cultivos de cítricos, frutales, hortalizas y plantas de adorno y de flor. Su alta eficacia contra pulgones y mosca blanca ha hecho que su uso se extienda rápidamente. En la revisión bibliográfica de este compuesto hemos encontrado referencias sobre su actividad, modo de acción, efectividad, propiedades físicas, químicas y toxicológicas (15-17, 54). Sin embargo, solo se ha encontrado una



publicación referida a la determinación de residuos de este compuesto en matrices vegetales. J. Placke y E. Weber (18) han desarrollado un método de análisis mediante HPLC-UV muy laborioso y con alto consumo de disolvente. La extracción de la muestra es seguida por múltiples pasos de clean-up que incluyen tres evaporaciones seguidas de particiones líquido-líquido o clean-up en cartuchos de extracción en fase sólida.



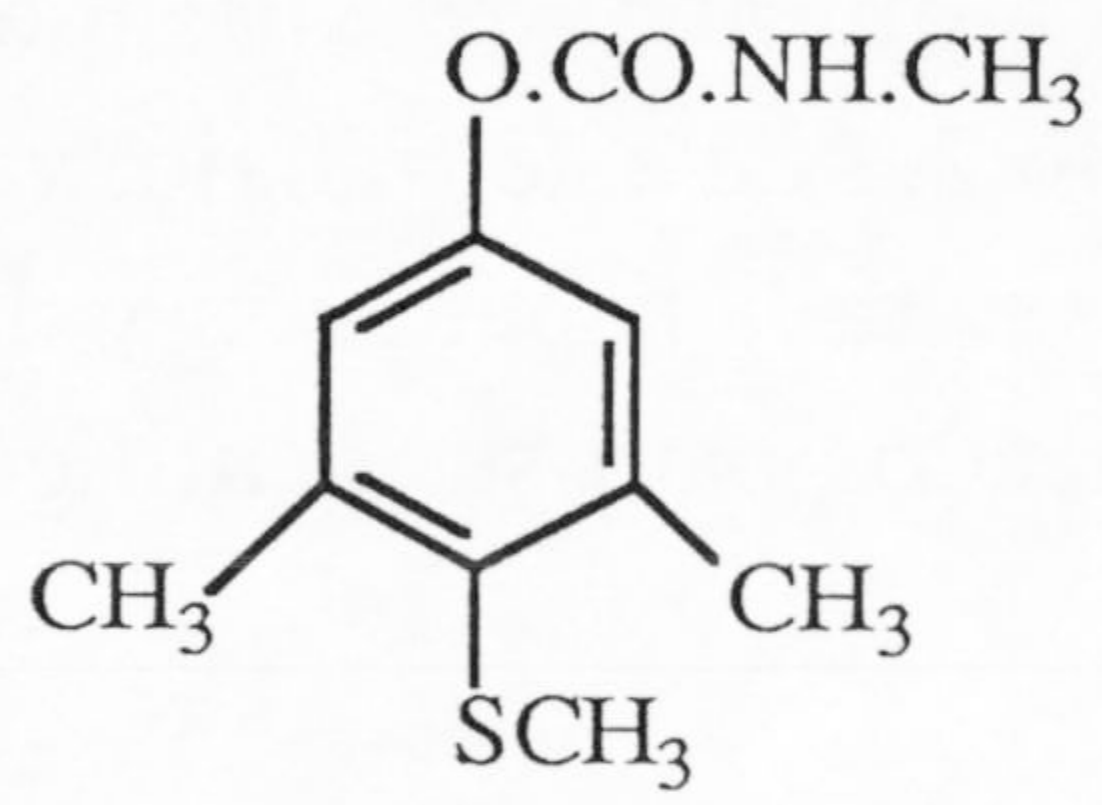
*Figura 5.1.- Fórmula del Imidacloprid.*

La escasez de información, en cuanto al proceso de extracción de Imidacloprid se refiere, nos llevó a enfocar nuestra investigación inicialmente hacia el análisis y cuantificación de este compuesto estudiando la posterior inclusión de otros NMCs para los que, a pesar de poder analizarse por GC, la utilización de esta técnica supone una mejora notable, sobre todo de cara a la inclusión en el análisis de sus metabolitos.

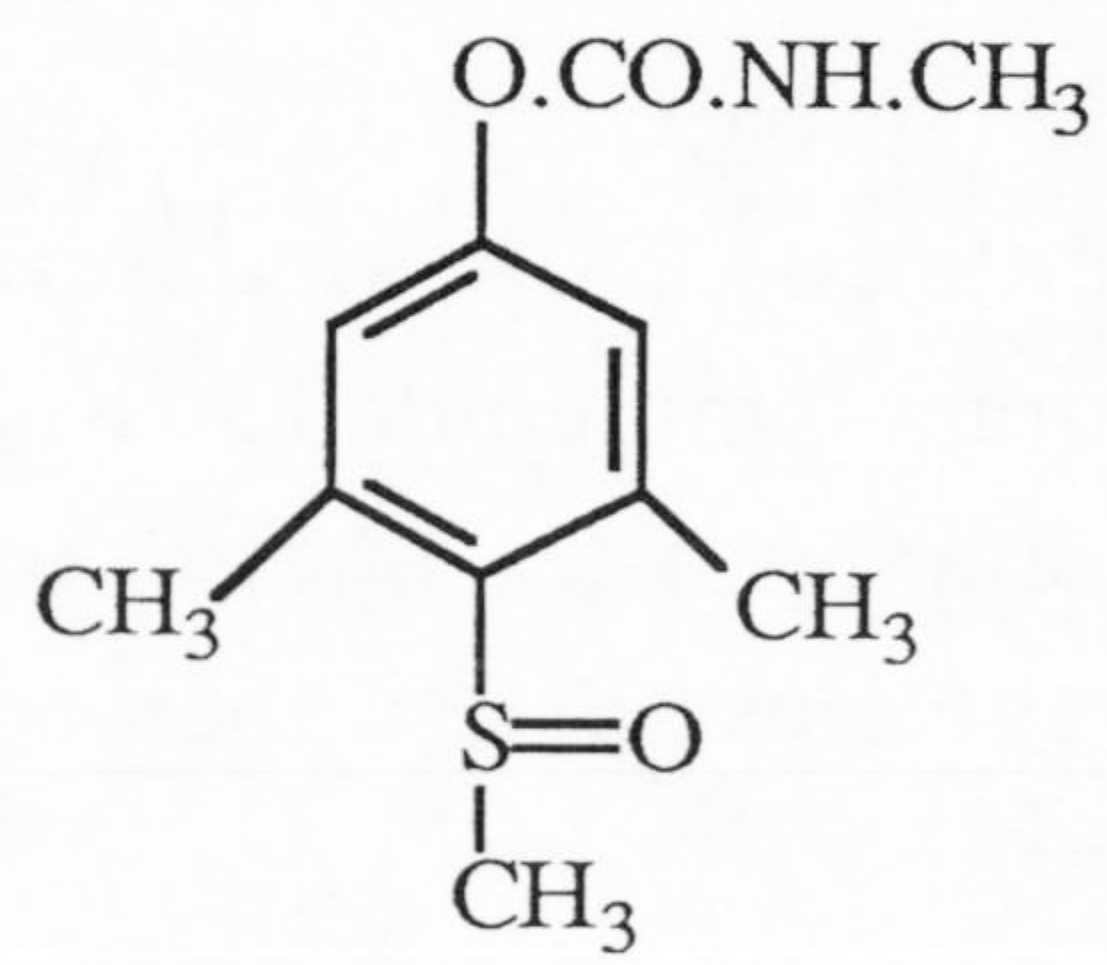
Los pesticidas carbámicos incluidos en este trabajo, por ser su uso frecuente en la zona del poniente almeriense, han sido: Metiocarb, Carbaril y Carbofurano y sus metabolitos Metiocarb sulfóxido, 1-Naftol y 3-Hidroxicarbofurano. Todos ellos son N-Metilcarbamatos excepto el 1-Naftol, producto de degradación del Carbaril, que ha perdido la parte N-metilcarbato. Sus estructuras se recogen en la Fig.5.2.

Desarrollar un MMRs por HPLC para Imidacloprid y este grupo de compuestos fue nuestro siguiente objetivo. De este modo, los pasos a seguir en nuestra investigación fueron los siguientes: 1) desarrollar un método cromatográfico de análisis por HPLC-DAD para Imidacloprid, el grupo de NMCs de interés y sus productos de transformación; 2) evaluar la eficacia de los sistemas de extracción más utilizados en MMRs, tales como el de Luke, Mills y Leary, con el fin de obtener un método rápido y sencillo para el análisis de Imidacloprid; 3) estudiar la posibilidad de ampliar el método desarrollado a la extracción del grupo de NMCs seleccionado.

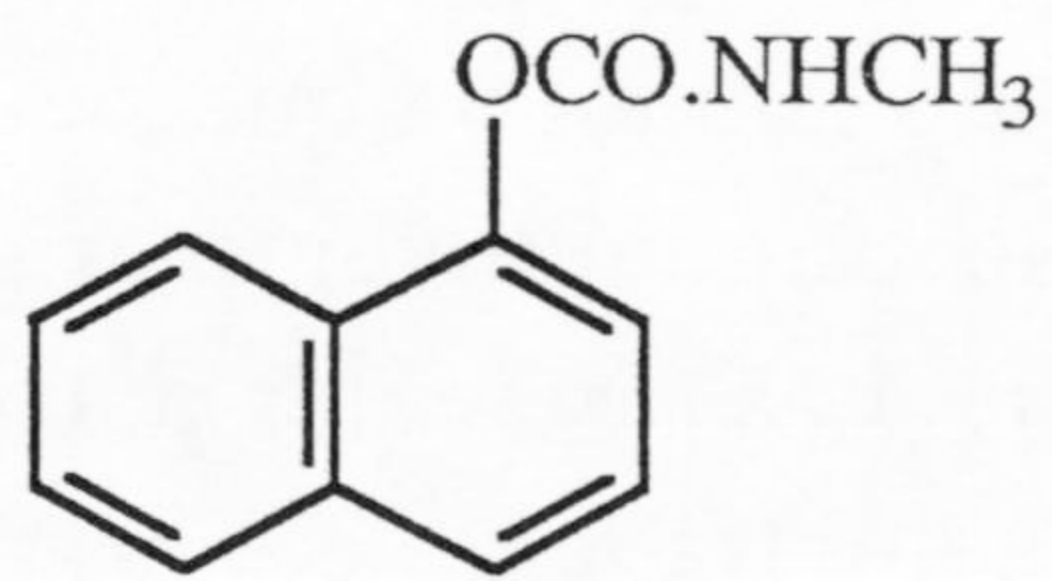




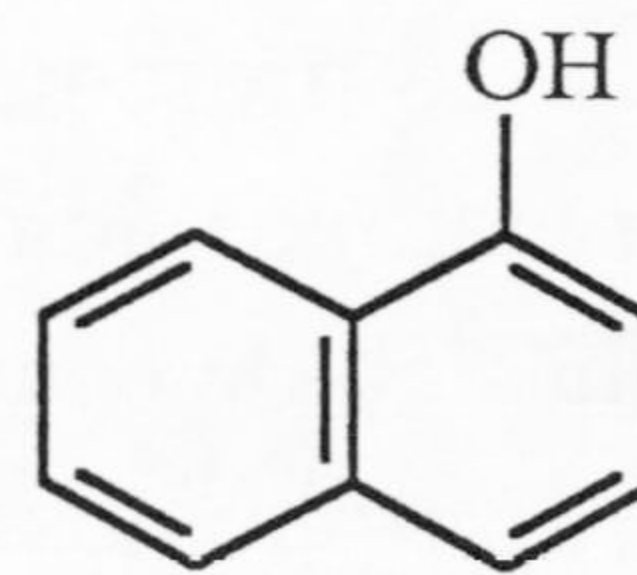
**Metiocarb**



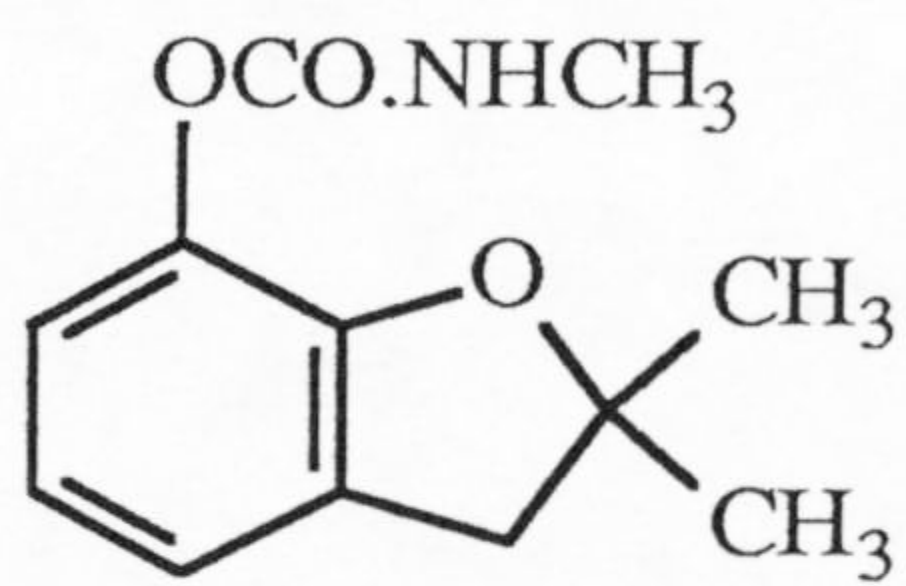
**Metiocarb sulfóxido**



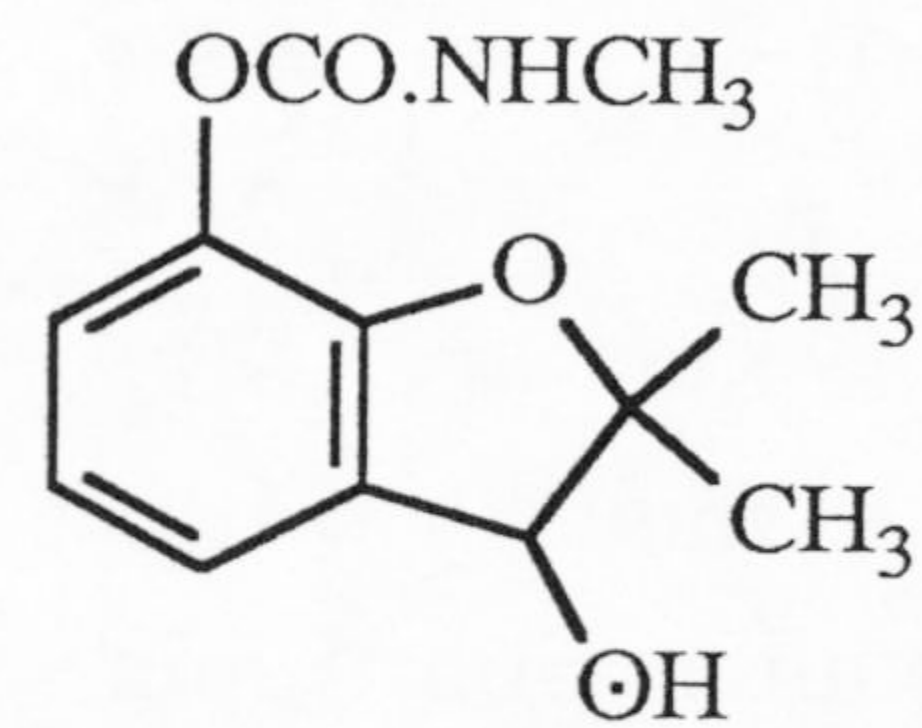
**Carbaril**



**1-Naftol**



**Carbofurano**



**3-Hidroxicarbofurano**

*Figura 5.2.- Fórmulas de los pesticidas carbámicos y sus metabolitos.*



## 5.2.- METODOS EXPERIMENTALES.

### 5.2.1 Análisis cromatográfico.

Se desarrolló un MMRs para el análisis de Imidacloprid y el grupo de NMCs seleccionados mediante HPLC con detector ultravioleta de fotodiodos en línea (DAD). Se trabajó en fase reversa con una columna de sílica enlazada químicamente con C-18, ya descrita en el apartado 2.4 de este trabajo, y provista de precolumna también de C-18. Las condiciones para la separación y detección de estos compuestos, así como los criterios utilizados para su identificación en matrices vegetales se describen a continuación.

#### 5.2.1.1.- Separación y detección.

La fase móvil seleccionada fue una mezcla de AcN:agua. El uso de AcN como modificador orgánico presenta ventajas frente al metanol ya que se disminuyen las posibles interacciones ácido-base del analito con el eluyente originadas por el débil carácter básico de estos compuestos (57). Las diferentes polaridades que presentan estos compuestos hizo recomendable trabajar en gradiente para facilitar su separación. La programación de la composición de la fase móvil en el tiempo se recoge a continuación:

Fase móvil:	<u>Tiempo</u>	<u>Conc. AcN</u>
	0 min	25%
	2 min	25%
	12 min	90%
	15 min	100%

Tiempo de equilibración: 5 min.

Flujo de fase móvil: 1 mL/min.

Los espectros UV de éstos compuestos presentaban máximos a diferentes longitudes de onda (55). La utilización de un detector UV/VIS de diodos nos permitió seleccionar en cada caso la más adecuada en base a conseguir una mayor selectividad y sensibilidad para cada compuesto. Los espectros UV de cada pesticida estudiado se muestran en la Fig. 5.3.



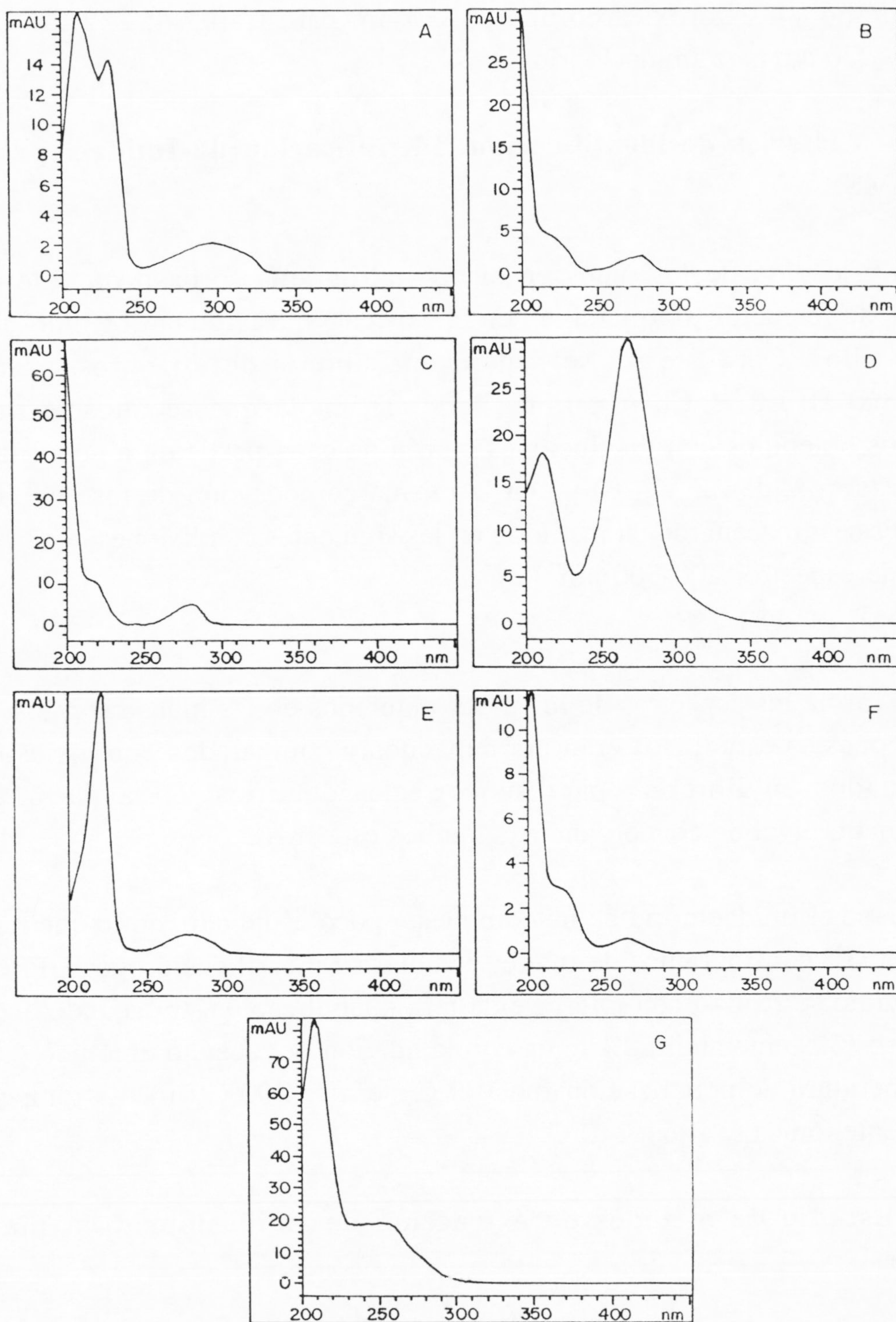


Figura 5.3.- Espectros UV de: A: 1-Naftol, B: Carbofurano, C: 3-Hidroxicarbofurano, D: Imidacloprid, E: Carbaril, F: Metiocarb y G: Metiocarb sulfóxido.



Se obtuvieron cromatogramas de la disolución mezcla de patrones de trabajo, descrita en el apartado 2.3.1, a: 210 nm para Metiocarb, Metiocarb sulfóxido, Carbofurano y 3-Hidroxicarbofurano; 220 nm para Carbaril; 232 nm para 1-Naftol y 270 nm para Imidacloprid.

#### **5.2.1.2.- Criterios de identificación. Identificación de Imidacloprid por HPLC-MS.**

La identificación de los picos en el cromatograma se basó no solo en los tiempos de retención sino también en el espectro ultravioleta obtenido de cada uno de ellos. Con este fin se generó una librería de espectros, usando el programa HPLC<sup>3D</sup> Chemstation (Serie II), en la que se almacenaron los espectros obtenidos con disoluciones patrón de cada pesticida a concentración elevada (aprox. de 2.5 mg/L) y con la misma composición de fase móvil. Los espectros se almacenaron en memoria en las siguientes condiciones:

Rango de espectro: 200-500 nm

Número de puntos: 5

Suavizado: 10.

De esta forma los espectros de los picos obtenidos en las muestras a los TR de los compuestos estudiados eran normalizados y comparados con los espectros almacenados en librería para su correcta identificación a partir de un determinado nivel de concordancia de ambos espectros.

Por tratarse el Imidacloprid de un compuesto poco estudiado, en lo que respecta a su análisis, consideramos de interés estudiar su identificación por HPLC-MS. Este estudio se realizó con interfase de termonebulización, trabajando en modo isocrático (50% metanol:50% agua con la adición de acetato amónico 0.05M). La temperatura de nebulización fue 100°C(stem) y 200°C(tip). La temperatura de la fuente iónica se fijó a 240°C.

#### **5.2.2.- Estudio de métodos de extracción de Imidacloprid en matrices vegetales.**

Para definir el método de extracción más adecuado para Imidacloprid se realizó un estudio comparativo entre diversos sistemas de extracción utilizados habitualmente en el análisis de pesticidas, como el método de Luke (41,42), Mills (37, 7) y Leary (43-45). Los tres procedimientos se aplicaron por triplicado



sobre muestras de pimiento, contaminadas con Imidacloprid a nivel de 0.20 mg/kg, obtenidas según la Directiva CE 79/700 (81)

*Procedimiento A.* Extracción con acetonitrilo (procedimiento basado en el método de Mills).

Una alícuota de 50 g de muestra contaminada era extraída a alta velocidad durante 5 min con 200 mL de acetonitrilo. La mezcla resultante era filtrada a través de un Buchner de 12 cm. El filtro se lavaba con una porción de 50 mL de acetonitrilo. El filtrado se transfería a un embudo de decantación (500 mL) al cual se le añadían 10 mL una disolución tampón de fosfato. Se agita el embudo fuertemente durante 1 min y se deja decantar en dos fases. La fase conteniendo acetonitrilo se filtraba a través de una capa de sulfato sódico anhidro (10 g) colocada en un embudo taponado con una pequeña porción de fibra de vidrio. El extracto ya filtrado se evaporaba a sequedad en rotavapor a 40-50°C. El volumen final se ajustó a 5 mL con acetonitrilo:agua (1:3) y se sometió a sonicación durante 5 min. La solución final se filtró a través de un filtro de membrana colocado en el extremo de la jeringa (5 mL) quedando listo para su análisis por HPLC. El esquema del método se recoge en la Fig. 5.4.

*Procedimiento B.* Extracción con acetona (procedimiento basado en el método de Luke).

50 g de muestra contaminada era extraída a alta velocidad durante 5 min con 100 mL de acetona. La mezcla resultante era filtrada a través de un Buchner de 12 cm. El filtro se lavaba con una porción de 50 mL de acetona. El filtrado se transfería a un embudo de decantación (500 mL) al cual se le añadía 200 mL de una mezcla de diclorometano:éter de petróleo (1:1). Se agita el embudo fuertemente durante 1 min y se deja decantar en dos fases. La fase conteniendo diclorometano se filtraba a través de una capa de sulfato sódico anhidro (10 g) colocada en un embudo taponado con una pequeña porción de fibra de vidrio. La otra fase se volvía a extraer con 50 mL de diclorometano. El extracto ya filtrado se evaporaba a sequedad en rotavapor a 40-50°C. El volumen final se ajustó a 5 mL con acetonitrilo:agua (1:3) y se sometió a sonicación durante 5 min. La solución final se filtró a través de un filtro de membrana colocado en el extremo de la jeringa (5 mL) quedando listo para su análisis por HPLC. El esquema del método se recoge en la Fig. 5.5.



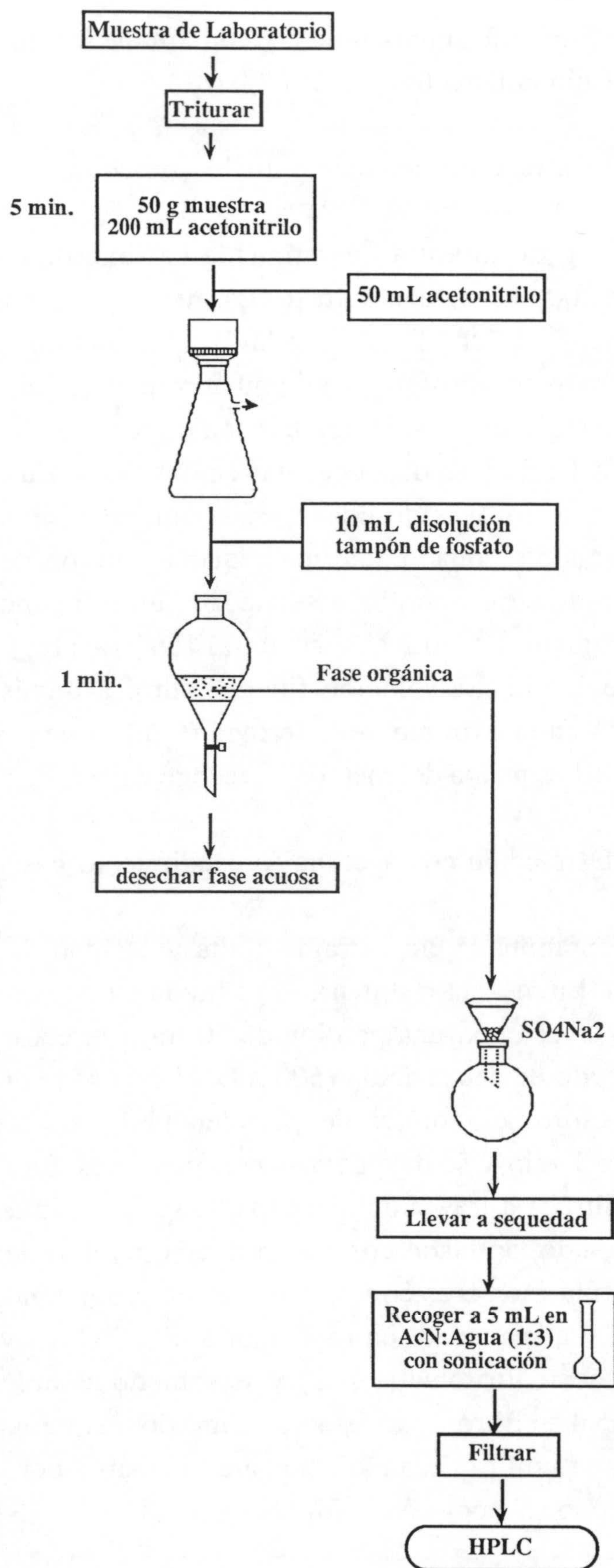


Figura 5.4.- Esquema del procedimiento de extracción A.



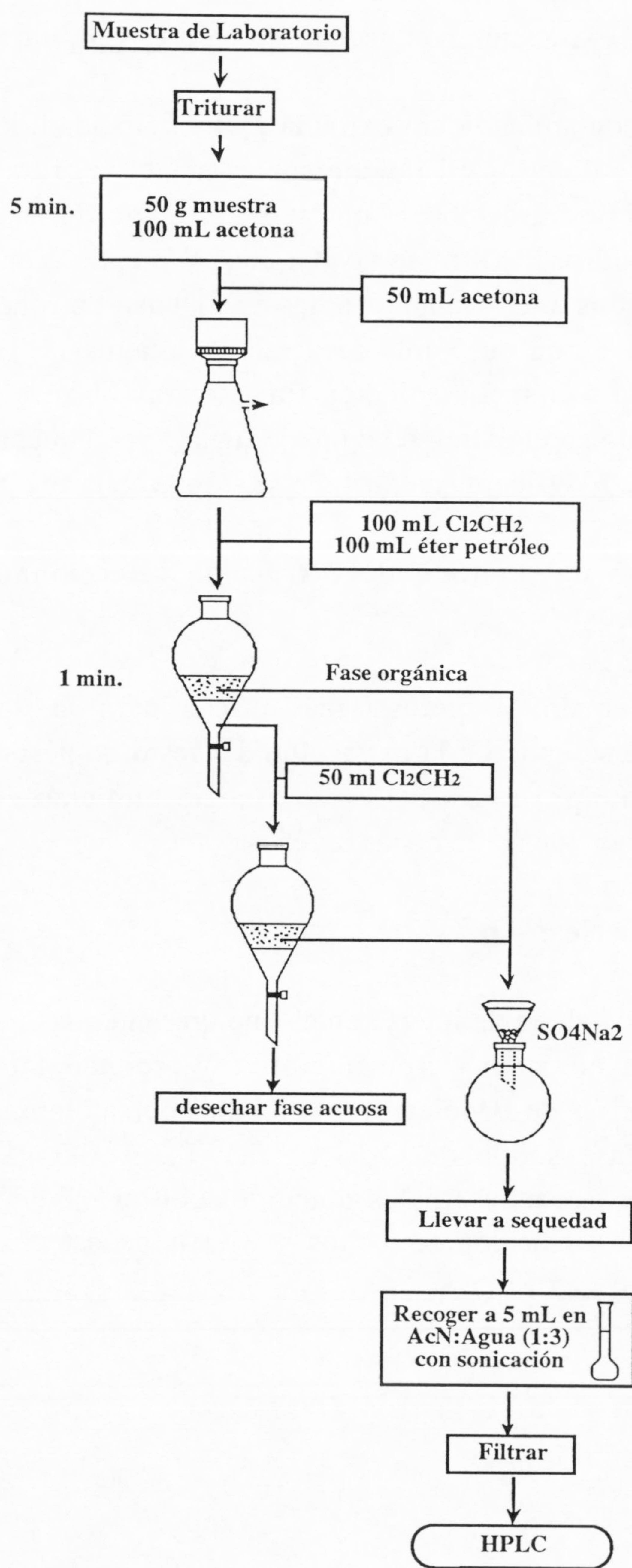


Figura 5.5.- Esquema del procedimiento de extracción B.



*Procedimiento C.* Extracción con acetato de etilo (procedimiento basado en el método Leary).

50 g de muestra contaminada era extraída a alta velocidad durante 5 min con 200 mL de acetato de etilo. El líquido sobrenadante se filtraba por succión a través de un papel de filtro sobre el que se había colocado una capa de 20 g de sulfato sódico anhidro. El filtro se lavaba con 50 mL de acetato de etilo y los extractos combinados eran evaporados hasta sequedad en rotavapor a 40-50°C. El residuo se redisolvió en 5 mL de acetonitrilo:agua (1:3) y se sometía a sonicación durante 5 min. La solución final se filtraba mediante un filtro de membrana colocado en el extremo de una jeringa (5 mL) quedando listo para su análisis por HPLC. El esquema del método se recoge en la Fig. 5.6.

### **5.2.3.- Aplicación del método de extracción seleccionado al grupo de NMCs estudiados.**

Una vez seleccionado el método más eficaz para la determinación de Imidacloprid éste se aplicó a la extracción del resto de pesticidas carbámicos citados en el capítulo 5.1. De nuevo se escogió pimiento como matriz más significativa para la realización de las pruebas.

### **5.2.4.- Estudios de clean-up.**

Debido a la gran cantidad de interferentes que presentan las matrices vegetales, que pueden dañar el sistema cromatográfico y producir falsos negativos, se estudia la aplicación de un clean-up adicional con columnas de extracción desechables en fase sólida de C-18 de 0.1, 0.3 y 0.5 g sobre el MMRs seleccionado. Los extractos finales obtenidos con el método (AcN:Agua) se hacían pasar a través de los cartuchos y 20 µL de este extracto limpio se inyectaban en el HPLC-DAD.



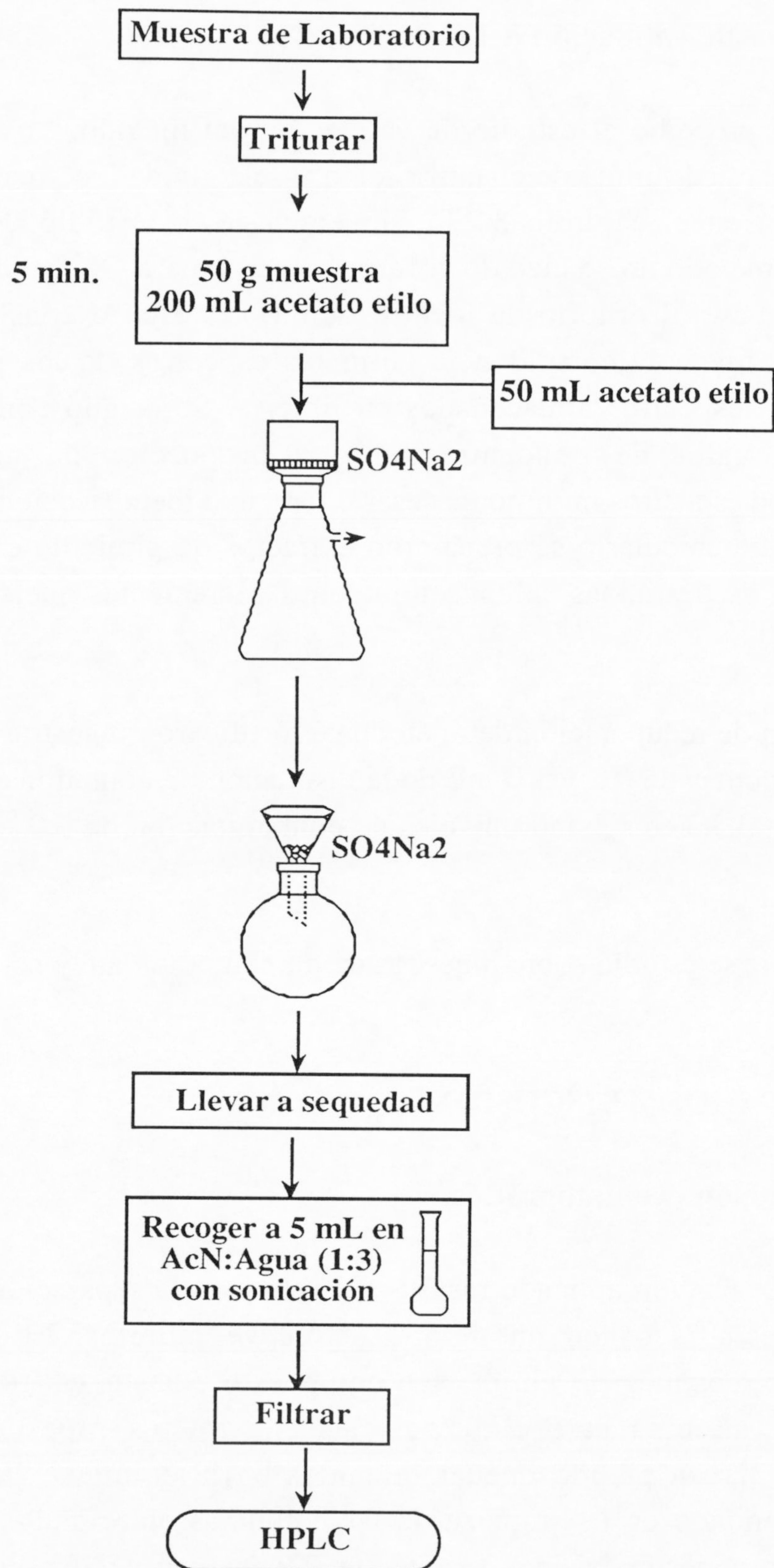


Figura 5.6.- Esquema del procedimiento de extracción C.



### 5.2.5.- Estudios de validación del método.

Finalmente se procedió al estudio de validación del método. Los estudios de precisión, linealidad, límite de cuantificación y selectividad se realizaron de la forma descrita en el capítulo 3.2.3. Sin embargo, el estudio del límite de detección del método no se hizo de la forma descrita para OPs y OCs, sino que se realizó en base al criterio de identificación ya descrito consistente en la obtención del nivel de coincidencia entre los espectros de los picos en las muestras y los espectros almacenados en librería. Se asignó como límite de detección el valor de concentración que proporcionaba un valor de coincidencia de espectros mínimo, necesario para una identificación positiva del compuesto. Para calcularlo se prepararon extractos de pimiento contaminados con la mezcla de pesticidas en concentraciones decrecientes que se analizaron por HPLC-DAD.

Para el estudio de recuperación del método se fortificaron muestras de pimiento (50 g) con alícuotas de 0.2 y 1.0 mL de la disolución de contaminación descrita en el apartado 2.3.3, resultando niveles de contaminación de 0.04-0.05 y 0.20-0.24 mg/kg.

El efecto matriz se estudio sobre muestras de pimiento, tomate y pepino.

## 5.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.3.1.- Separación cromatográfica.

El gradiente de elución aplicado resultó efectivo para la separación de los siete compuestos estudiados en un tiempo de nueve minutos. El gradiente se mantiene, aún después de eluirse los compuestos, hasta un 100% de AcN durante unos minutos para eluir posibles coextractos procedentes de las muestras que hayan podido quedar retenidos en la columna. Es importante extremar el cuidado en la limpieza de las columnas entre análisis cuando se trabaja con compuestos básicos ya que sus TR pueden verse afectados por el deterioro de los grupos silanoles de la columna (57).



En la Fig. 5.7 se muestra un cromatograma de la mezcla de patrones en concentraciones de 0.20-0.24 mg/kg, obtenido a diferentes longitudes de onda. Los tiempos de retención se recogen en la Tabla 5.1.

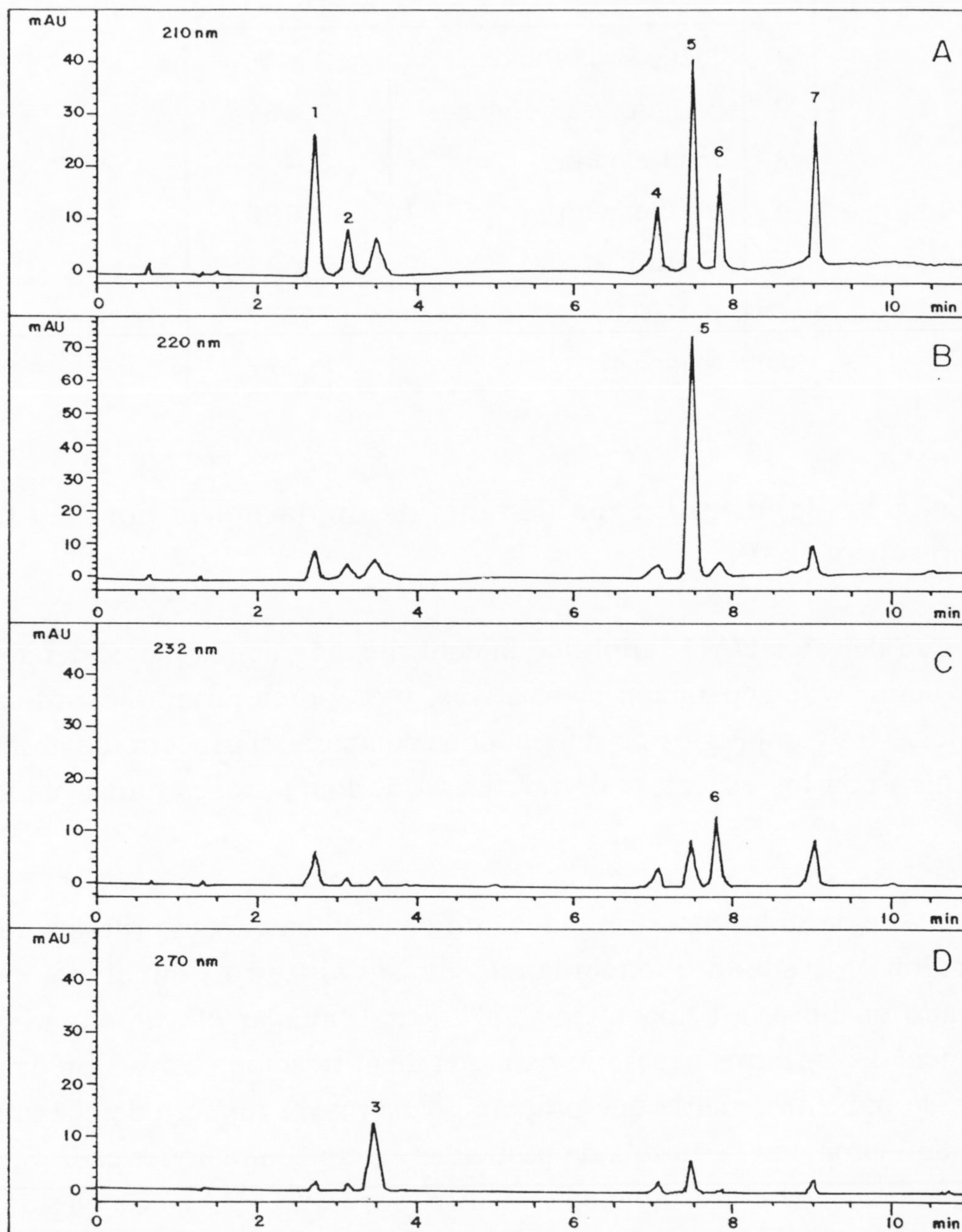


Figura 5.7.- Cromatograma HPLC-DAD de la mezcla de patrones (0.20-0.24 mg/kg). Los números sobre los picos corresponden con los de la Tabla 5.1.



TABLA 5.1

*Tiempos de retención de los pesticidas estudiados.*

Nº	Compuesto	Tr (min)
1	Metiocarb sulfoxido	2,646
2	3-Hidroxicarbofurano	3,065
3	Imidacloprid	3,408
4	Carbofurano	6,999
5	Carbaril	7,432
6	$\alpha$ -Naftol	7,777
7	Metiocarb	8,977

### 5.3.2.- Criterios de identificación. Estudio de Imidacloprid por HPLC-MS con Termospray (TSP).

El uso de un detector DAD simplificó la confirmación de los picos, evitando el uso de columnas de separación alternativas, y proporcionó una identificación más fiable de los compuestos permitiéndonos comparar el espectro de absorción de cada pico con los espectros de referencia de los patrones almacenados en librería.

Así cada pesticida en las muestras era identificado en base a dos criterios: tiempo de retención y grado de concordancia de su espectro con el del patrón almacenado en librería ("spectra match"). Para calcular el valor mínimo de coincidencia de espectros necesario para una identificación positiva preparamos extractos de pimiento, matriz que proporcionaba mayor número de coextractos, y se contaminaron con la mezcla de pesticidas en concentraciones cada vez más bajas realizándose el correspondiente análisis por HPLC-DAD. Se eligió como límite de identificación positiva aquellas concentraciones que daban valores de concordancia de espectros iguales o superiores a 920. Estas concentraciones se consideraron como límite de detección del método y serán, junto con los valores de concordancia de espectros obtenidos, especificadas más adelante (Tabla 5.4).



En el caso de Imidacloprid, el análisis por HPLC-MS demostró la aplicabilidad de la interfase de termospray para la identificación de Imidacloprid en muestras vegetales. Se estudió también la dependencia entre las abundancias de los iones del espectro de masas del Imidacloprid en fase gaseosa y la temperatura de vaporización en modo de ionización positiva (PI). Un incremento en la temperatura de la fase gaseosa condujo a incrementar la fragmentación según se muestra en la Fig. 5.8 y según se describe en la literatura más reciente (47). El pico base corresponde al ión de  $m/z$  256 correspondiente a  $[M-H]^+$ . Cuando la temperatura de la fuente iónica era de al menos  $220^{\circ}\text{C}$ , se observó la fragmentación a  $m/z$  211 que correspondía al ión  $[M+2H-NO_2]^+$ . Las variaciones en la temperatura del vaporizador tenían solo una ligera influencia en la fragmentación.

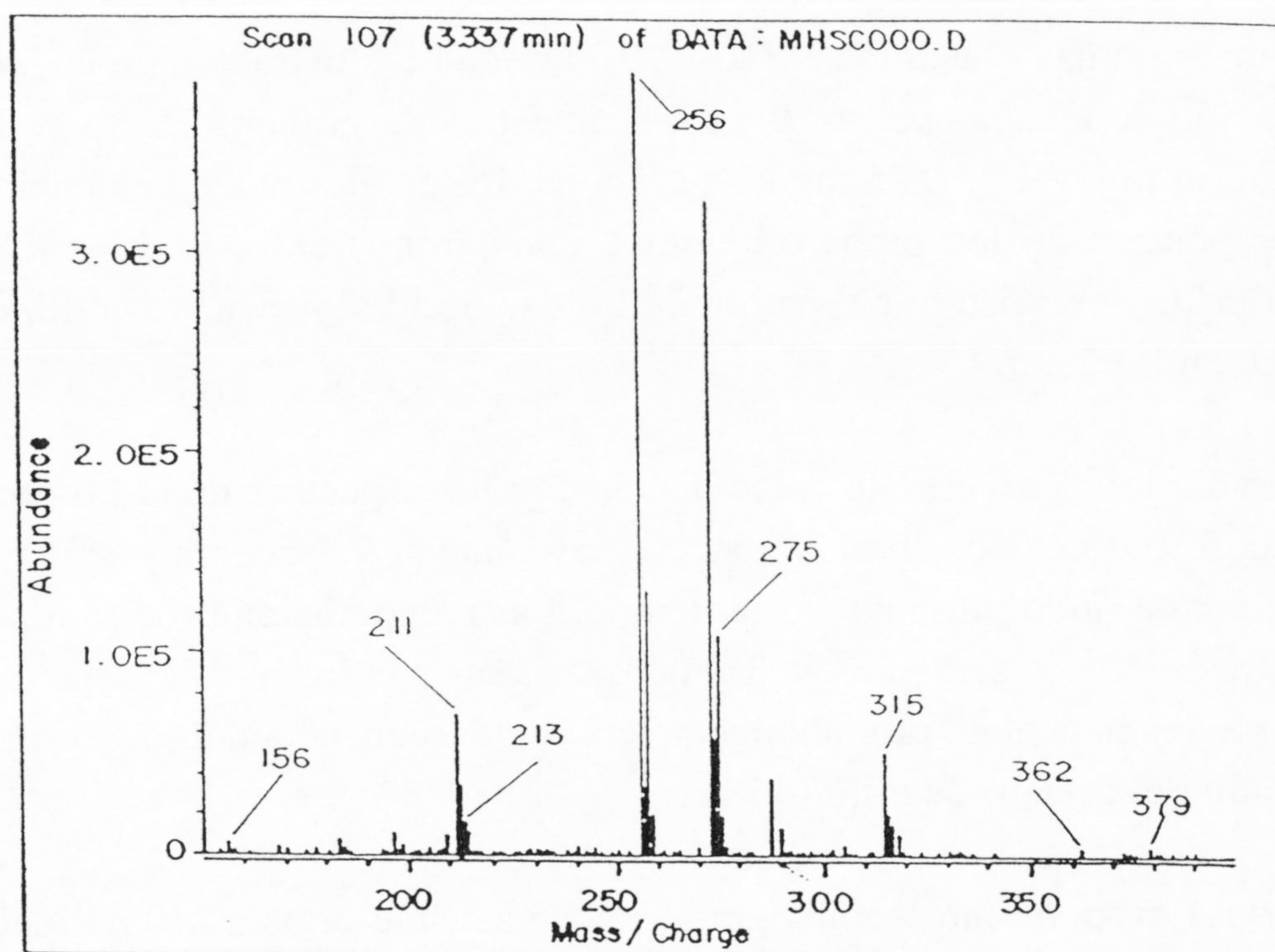


Figura 5.8.- Espectro TSP-MS de Imidacloprid (500 ng) en modo PI. Fase móvil metanol:agua (50:50) + acetato amónico 0.05 M; velocidad de flujo 1 mL/min. Temperatura de TSP  $100^{\circ}\text{C}$  (stem) y  $200^{\circ}\text{C}$  (tip). Temperatura de la fuente iónica:  $240^{\circ}\text{C}$ .

Por otro lado, se observó que utilizando como fase móvil agua-metanol y acetato amónico (0.05M) como aditivo aparecían agrupaciones de iones del tipo  $[M+NH_4]^+$ ,  $m/z$  273;  $[M+H+MeOH]^+$ ,  $m/z$  288 y  $[M+H+CH_3CONH_2]^+$ ,  $m/z$  315, cuya abundancia relativa disminuía al aumentar la temperatura de la fase



gaseosa. También pueden aparecer aductos de Imidacloprid con acetamida, impureza incluida en la sal de acetato amónico comercializada por Merck, debido a que el Imidacloprid presenta afinidad por un protón próxima o inferior a la de la acetamida (48). La fragmentación inducida y los grupos de iones pueden ser muy útiles en la identificación de Imidacloprid en muestras reales.

El límite de detección de Imidacloprid por esta técnica, utilizando una columna RP C-18 y en modo PI se estimó en 20 ng con barrido de iones y 500 pg trabajando con monitorización de iones seleccionados (modo SIM) usando dos iones diagnóstico ( $m/z$  211, 256).

### 5.3.3.- Selección del método de extracción para Imidacloprid.

Los cromatogramas obtenidos a 210 y 270 nm con los extractos procedentes de la aplicación de los *métodos A, B y C* en muestras de pimiento fortificadas con Imidacloprid (a nivel de 0.25 mg/kg), así como los niveles de coincidencia (s.m.) de los espectros de los picos obtenidos a 3.4 min, tiempo de retención del Imidacloprid, y el espectro del patrón de Imidacloprid almacenado en librería, se presentan en la Fig. 5.9.

Se observó que los niveles de coincidencia con los espectros de la librería (e.m. en la Fig. 5.9) obtenidos en el *método C* presentaban valores muy bajos debido al alto nivel de ruido presente a este tiempo. Las recuperaciones de Imidacloprid con los tres métodos se dan en la Tabla 5.2. Estas son buenas para los *métodos A y B* y peores para el *C*, probablemente como consecuencia del menor poder de solvatación del acetato de etilo (46).

El *método A* proporcionó cromatogramas poco satisfactorios a 210 nm debido al gran número de compuestos interferentes coeluídos, especialmente en los primeros seis minutos del cromatograma. En comparación, el método de la acetona es más limpio, puede usarse con matrices con alto contenido en azúcar debido a que no forma un sistema de dos fases con el agua en presencia de azúcar (42), y el paso de evaporación del disolvente es más rápido. En consecuencia, éste fue el método seleccionado. Los extractos obtenidos contienen 10 g/mL de muestra, factor que se tendrá que tener en cuenta a la hora de expresar los resultados como mg de pesticida por kg de producto vegetal.



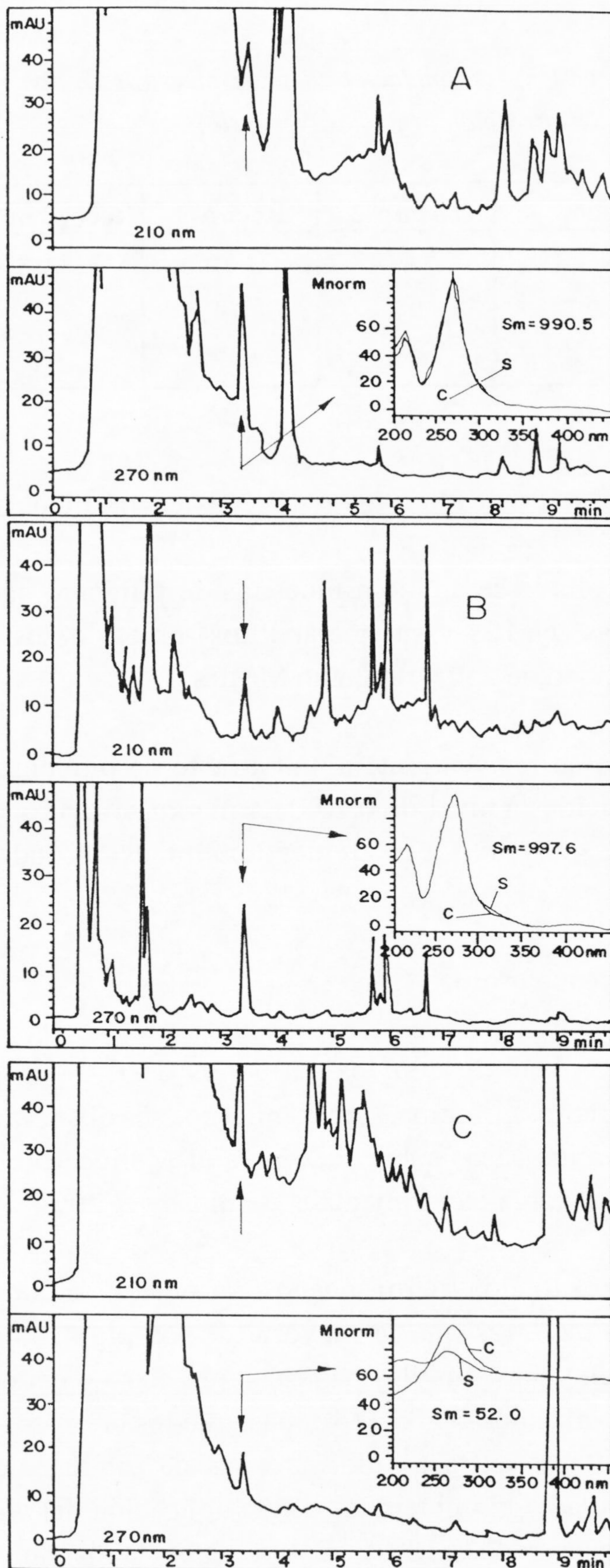


Figura 5.9.- Cromatogramas obtenidos con la aplicación con los 3 métodos de extracción.



TABLA 5.2

Datos de recuperación (%) de Imidacloprid sobre muestras de pimiento con la aplicación de los tres métodos de extracción probados (ver texto).

Método	Recup-1	Recup-2	Recup-3	Recup. media	CV(%)
A	110	105	102	106	3,8
B	97	93	94	95	2,2
C	56	63	57	59	6,4

#### 5.3.4.- Aplicación del método a los pesticidas carbámicos seleccionados.

El método desarrollado se aplicó a muestras de pimiento contaminadas con el resto de pesticidas (NMCs y sus metabolitos) objeto de estudio con el fin de estudiar la posibilidad de aplicarlo como MMRs.

Un cromatograma correspondiente a un extracto de pimiento contaminado con la mezcla de pesticidas a nivel de 0.20-0.24 mg/kg se representa en la Fig. 5.10. El cromatograma se obtuvo a diferentes longitudes de onda: 210, 220, 232 y 270 nm.

#### 5.3.5.- Estudios de clean-up.

La aplicación del clean-up con los cartuchos de C-18 de 0.1, 0.2 y 0.5 g, proporcionó extractos limpios, sin embargo se observaron pérdidas por retención en todos los casos sobre todo para el Metiocarb que incluso con los cartuchos de menor carga experimentaba pérdidas del 20%.

No obstante, los resultados fueron buenos para el Imidacloprid ya que éste no quedaba retenido mientras que la mayoría de los pigmentos eran eliminados obteniéndose un eluyente amarillo pálido, verde claro o sin color, dependiendo de la muestra vegetal. En la Fig. 5.11 se muestran los cromatogramas a 210 y 270 nm correspondientes a extractos de muestras de pimiento contaminadas con 0.01 mg/kg de Imidacloprid obtenidos con la aplicación del *método B*, sin clean-up (A) y con el clean-up de C-18 (B). Es apreciable la disminución en el ruido de base con el clean-up.



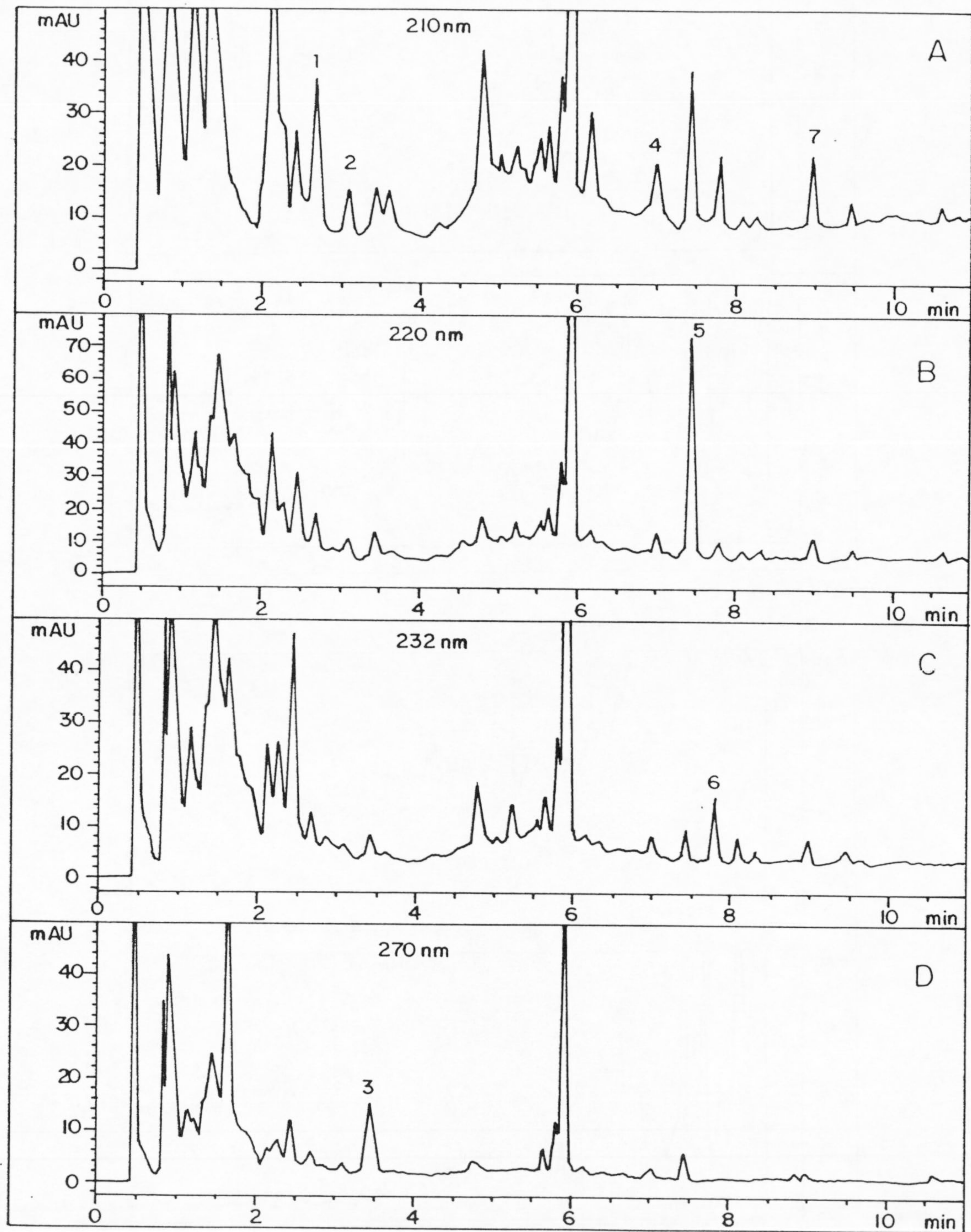


Figura 5.10.- Cromatograma HPLC-DAD correspondiente a un extracto de pimiento contaminado con la mezcla de pesticidas a nivel de 0.20-0.24 mg/kg. Los números identificativos de los picos corresponden con los de la Tabla 5.1.



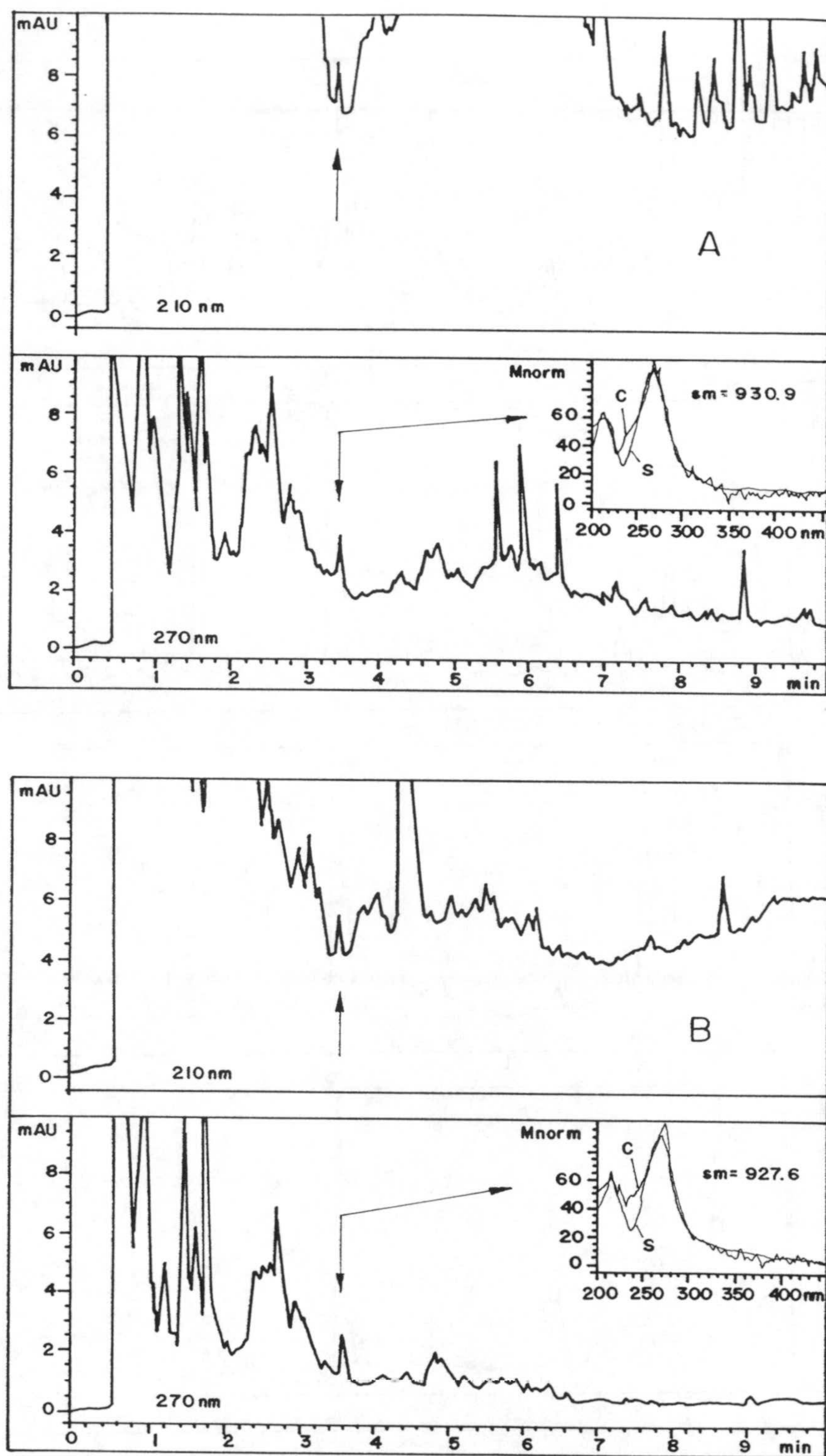


Figura 5.11.- Cromatogramas HPLC-DAD de extractos de pimiento fortificados con Imidacloprid (0.01 mg/kg), sin clean-up (A) y con clean-up (B) en cartuchos de sílica enlazados con C-18 de 0.1 g.



### 5.3.6.- Validación del método.

Se estudió la precisión del método calculando la repetitividad y reproducibilidad de los tiempos de retención y de las alturas de los picos a la longitud de onda correspondiente (Tabla 5.3). Se escogió la medida de alturas para la cuantificación de los picos por proporcionar mejor repetitividad. Los CV (%) obtenidos en el cálculo de la repetitividad oscilaron entre el 2.07-3.57% para las alturas de pico y 0.10-0.48% para los TR. Cuando los análisis se realizaban en días diferentes los coeficientes de variación eran algo mayores, del 4.71% al 6.00% para las alturas de pico y del 0.29% al 0.38% para los TR. No obstante en todos los casos fueron aceptables.

**TABLA 5.3**

*Estudio de la precisión del método. Cálculo de la repetitividad y reproducibilidad, expresadas en términos de coeficientes de variación (%), de los tiempos de retención y alturas de pico de los compuestos estudiados.*

Compuesto	Repetitividad (CV %)		Reproducibilidad (CV %)	
	TR	Altura de pico	TR	Altura de pico
Metiocarb sulfóxido	0,38	2,32	0,35	4,90
3-Hidroxicarbofurano	0,37	3,28	0,29	5,27
Imidacloprid	0,20	2,07	0,37	4,71
Carbofurano	0,48	2,63	0,38	6,00
Carbaril	0,10	3,09	0,33	5,02
1-Naftol	0,22	3,57	0,29	5,80
Metiocarb	0,10	2,40	0,31	4,62

Se estudió el rango dinámico lineal de la respuesta del detector entre 0.10 y 5.0 mg/L, lo que equivale a 2.0 y 100.0 ng en cantidad absoluta inyectada (2.0-120.0 ng para Imidacloprid). Los coeficientes de correlación fueron buenos (> 0.9979).

Los límites de detección obtenidos, calculados de la forma descrita en el apartado 5.3.2, oscilaron entre  $1.9 \times 10^{-3}$  mg/kg para Metiocarb y  $1.0 \times 10^{-2}$



mg/kg para 3-Hidroxicarbofurano. El límite de cuantificación se fijó entre 0.01-0.03 mg/kg en todos los casos. A este nivel los picos eran bien identificados al compararlos con la librería, con valores de coincidencia de espectros superiores a 920. Los datos de rango lineal, coeficiente de correlación, límite de detección y límite de cuantificación están recogidos en la Tabla 5.4.

**TABLA 5.4**

*Rango lineal, coeficiente de correlación, límite de detección, límite de cuantificación y valor de concordancia de espectros (e.m.) obtenido a la concentración correspondiente al límite de detección.*

Compuesto	Rango lineal (ng)	r	L.D. (mg/kg)	L.C. (mg/kg)	e.m.
Metiocarb sulf.	2,0-100,0	0,9988	0,0062	0,02	923
3-Hidroxicarb.	2,0-100,0	0,9979	0,0104	0,03	921
Imidacloprid	2,0-120,0	0,9982	0,0048	0,01	926
Carbofurano	2,0-100,0	0,9993	0,0044	0,01	920
Carbaril	2,0-100,0	0,9997	0,0031	0,01	937
1-Naftol	2,0-100,0	0,9998	0,0028	0,01	925
Metiocarb	2,0-100,0	0,9998	0,0019	0,01	928

Los ensayos para determinar el grado de recuperación del método se realizaron sobre muestras fortificadas de pimiento a niveles de 0.04-0.05 y 0.20-0.24 mg/kg (Tabla 5.5). Las recuperaciones son similares para ambos niveles y oscilaron entre el 70-99% para el nivel más bajo y 80-100% para el más alto. La reproducibilidad de la extracción fue buena en todos los casos, con coeficientes de variación entre el 2.3% y el 15.60%. La cuantificación se realizó mediante patrón externo. Los patrones de trabajo se preparaban diariamente para evitar descomposiciones de los pesticidas en presencia de agua.



TABLA 5.5

*Recuperaciones medias (n=5) y coeficientes de variación obtenidos en muestras de pimiento contaminadas a dos niveles de contaminación (0.04-0.05 y 0.02-0.24 mg/kg).*

Compuesto	Nivel-1 (0.04-0.05 mg/kg)		Nivel-2 (0.20-0.24 mg/kg)	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Metiocarb sulfóxido	95	8,8	100	8,3
3-Hidroxicarbofurano	91	11,3	95	9,8
Imidacloprid	99	3,5	94	2,3
Carbofurano	83	10,7	85	5,7
Carbaril	70	7,6	84	5,3
1-Naftol	82	8,2	86	9,3
Metiocarb	74	11,9	80	10,5

Se aplicó el método descrito a muestras de tomate y pepino, no observándose en los blancos picos que pudieran interferir con los compuestos de interés. Así mismo se fortificaron muestras de ambas matrices con la mezcla de pesticidas y se comprobó la recuperación del método. Los resultados fueron similares en todos los casos como puede apreciarse en la Fig. 5.11 en donde se representan las recuperaciones medias obtenidas en dos extracciones de cada matriz fortificada con 0.20-0.24 mg/kg de cada compuesto. Se incluyen también las recuperaciones para pimiento. Los pesticidas fueron identificados correctamente en todos los casos.



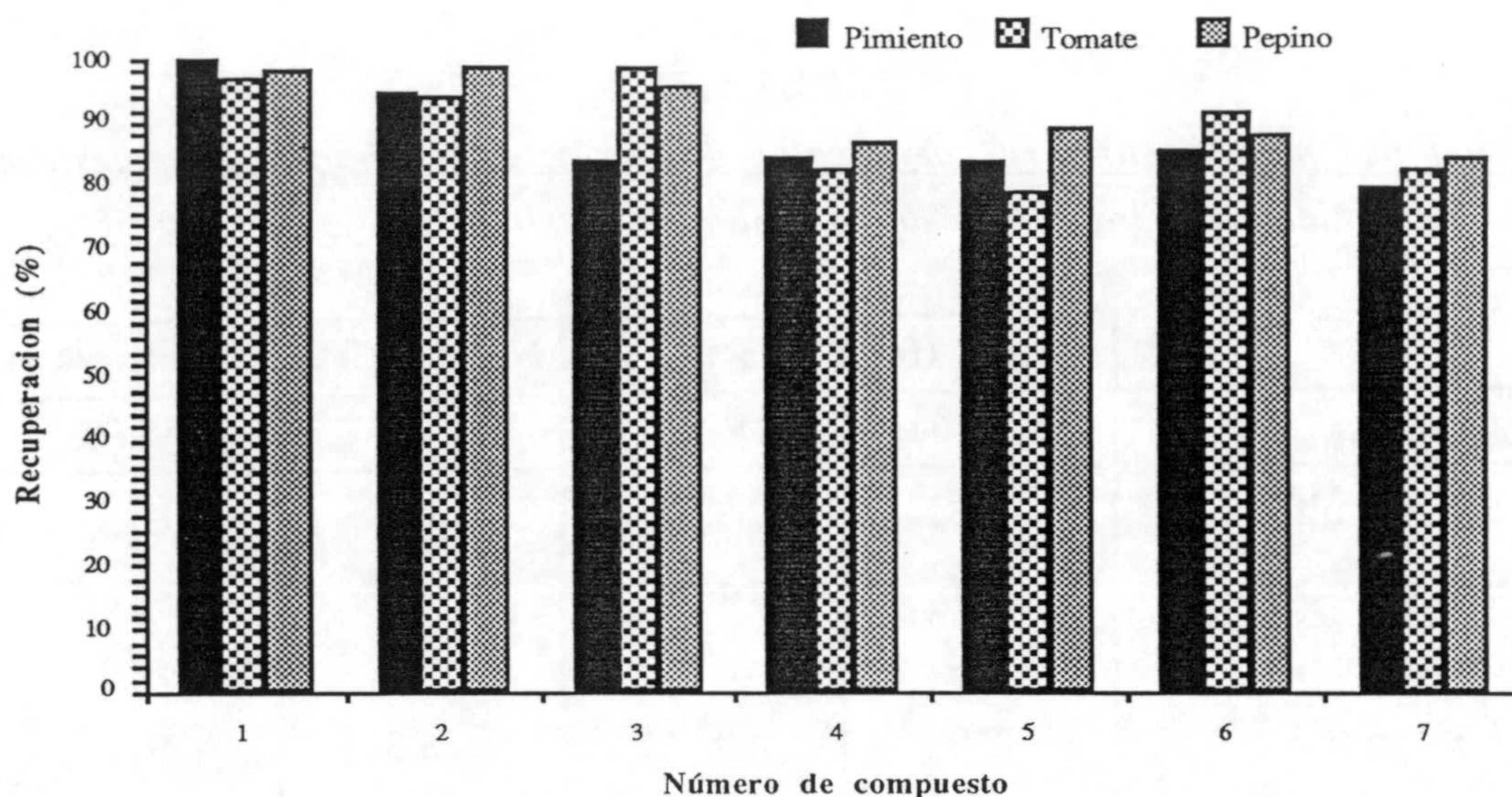


Figura 5.12.- Estudio del efecto matriz en las recuperaciones.

### 5.3.7.- Aplicación del método a muestras reales.

El método desarrollado se aplicó a 54 muestras de pimiento, tomate y pepino, procedentes de tres plantaciones diferentes, que habían sido tratadas con Confidor 20LS (Bayer A.G., 20% p/v de Imidacloprid) y Mesurol 50PM (Bayer A.G., 50% p/v de Metiocarb) en distintas dosis y recolectadas durante un periodo de una semana después de su tratamiento. Los resultados encontrados se recogen en las Fig. 5.13-5.14 .

Tanto Imidacloprid como Metiocarb fueron encontrados en todas las muestras en el rango de 0.01-0.30 mg/kg de Imidacloprid y 0.01-1.20 mg/kg de Metiocarb. Se observó también la aparición del metabolito Metiocarb sulfóxido, cuya concentración aumentaba inicialmente al disminuir la de Metiocarb. Datos de este compuesto se recogen en la Fig. 5.15.

Un ejemplo de cromatograma obtenido en el análisis de estas muestras se muestra en la Fig. 5.16, correspondiente a un extracto de tomate.



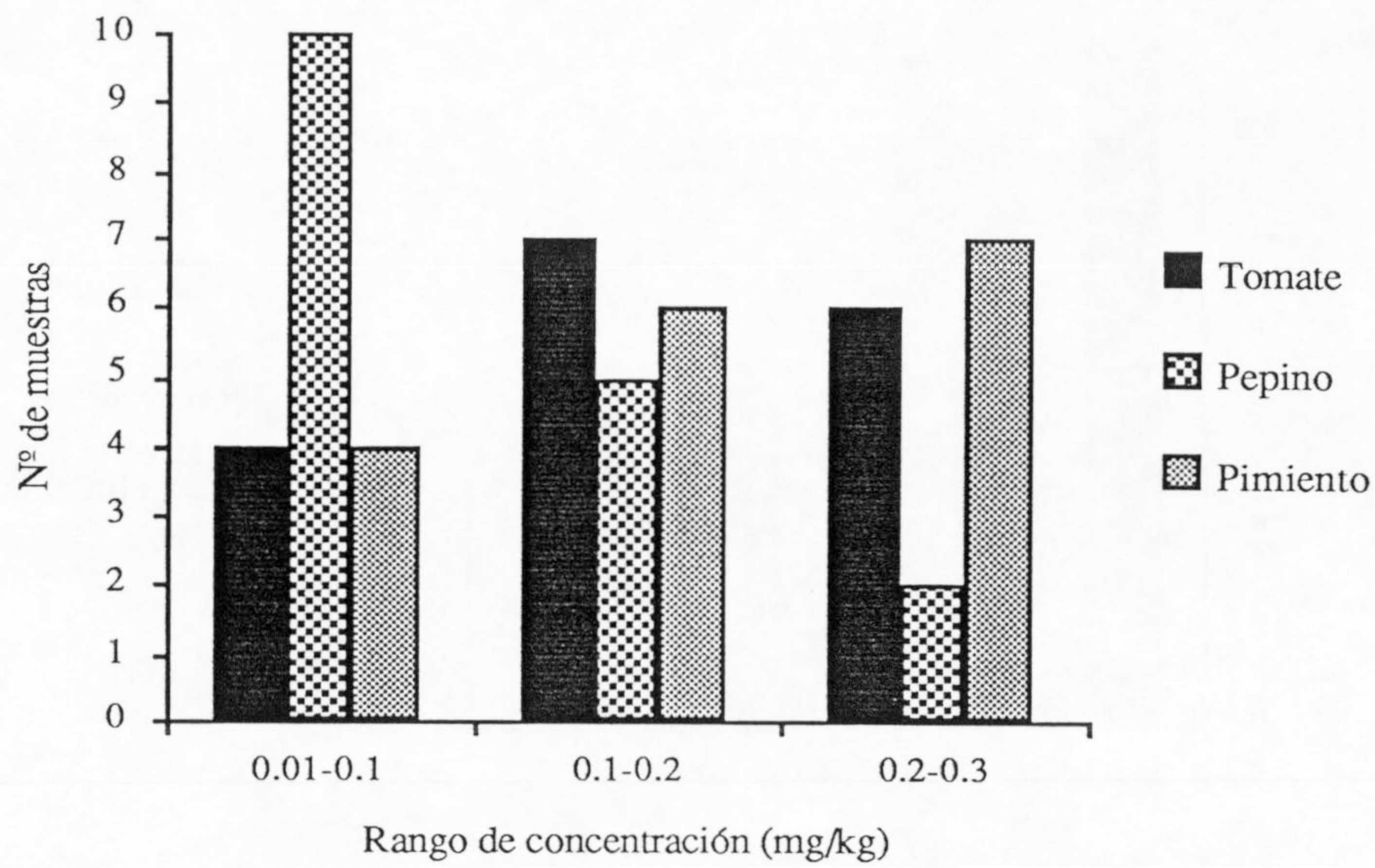


Figura 5.13.- N° de muestras de tomate, pepino y pimiento conteniendo residuos de Imidacloprid en los rangos de concentración de 0.01-0.1, 0.1-0.2 y 0.2-0.3 mg/kg.

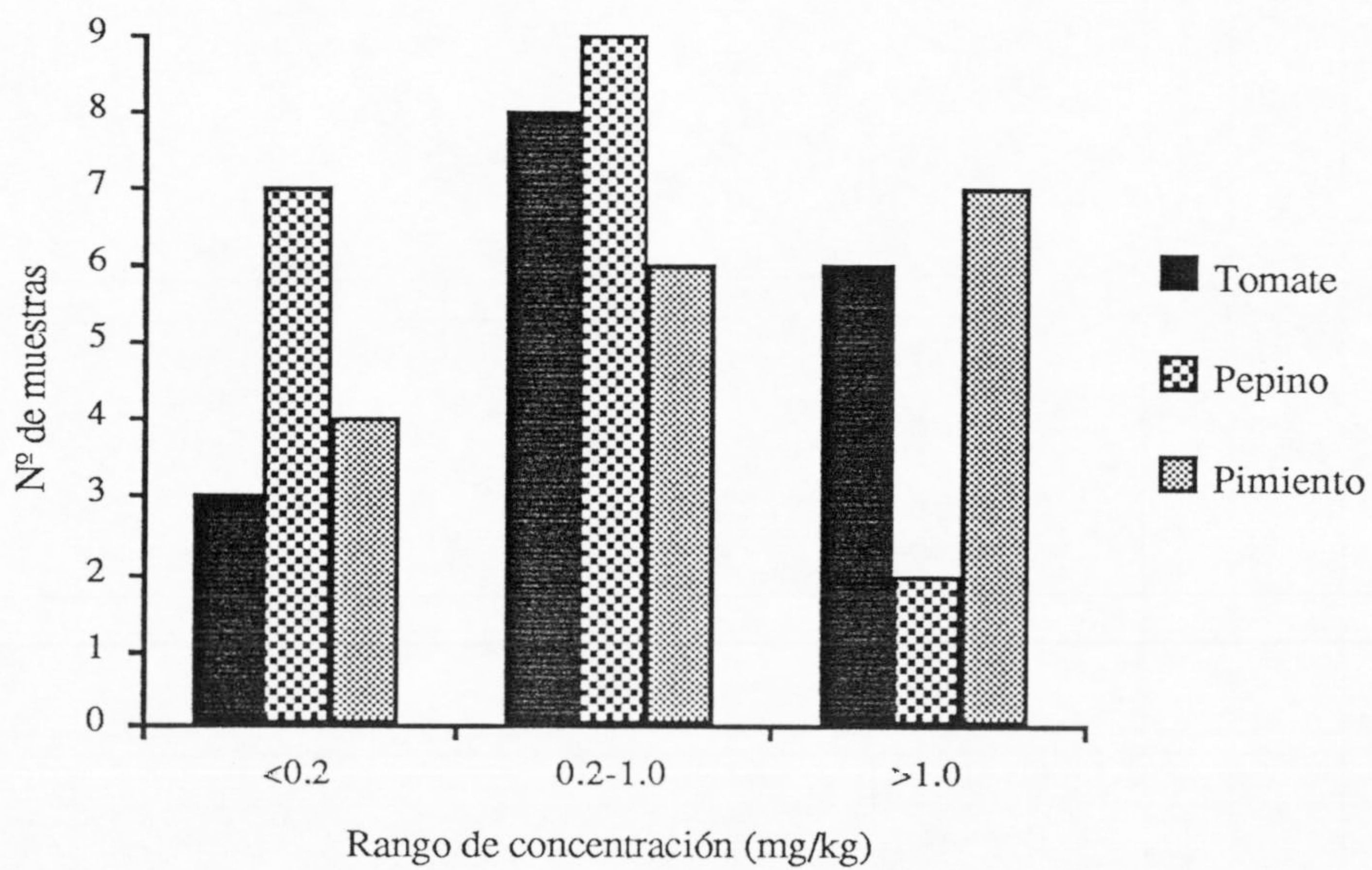


Figura 5.14.- N° de muestras de tomate, pepino y pimiento conteniendo residuos de Metiocarb en los rangos de concentración de <0.2, 0.2-1.0 y >1.0 mg/kg.



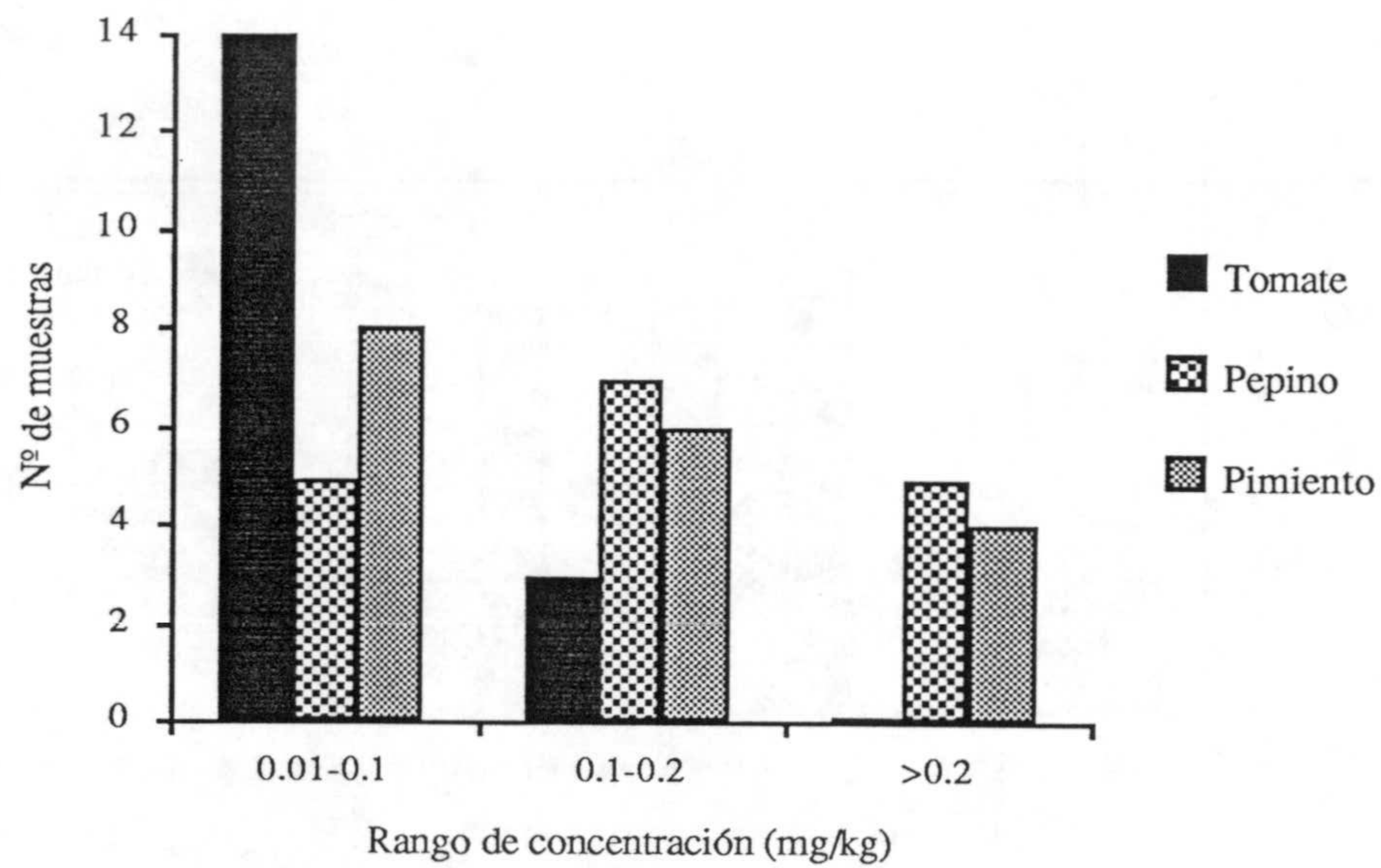


Figura 5.15.- Nº de muestras de tomate, pepino y pimiento conteniendo residuos de Metiocarb sulfóxido en los rangos de concentración de 0.01-0.1, 0.1-0.2 y >0.2 mg/kg.

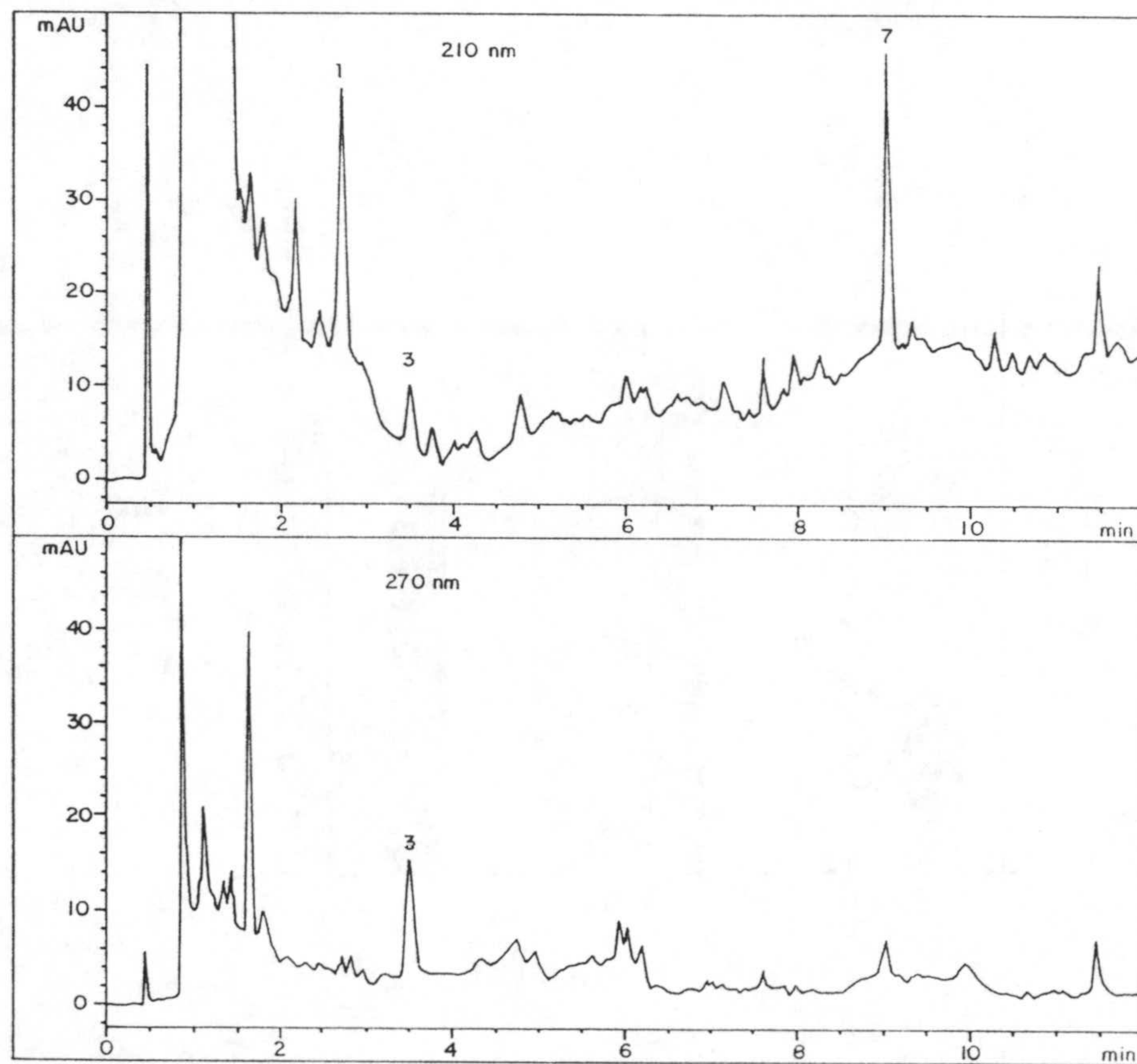


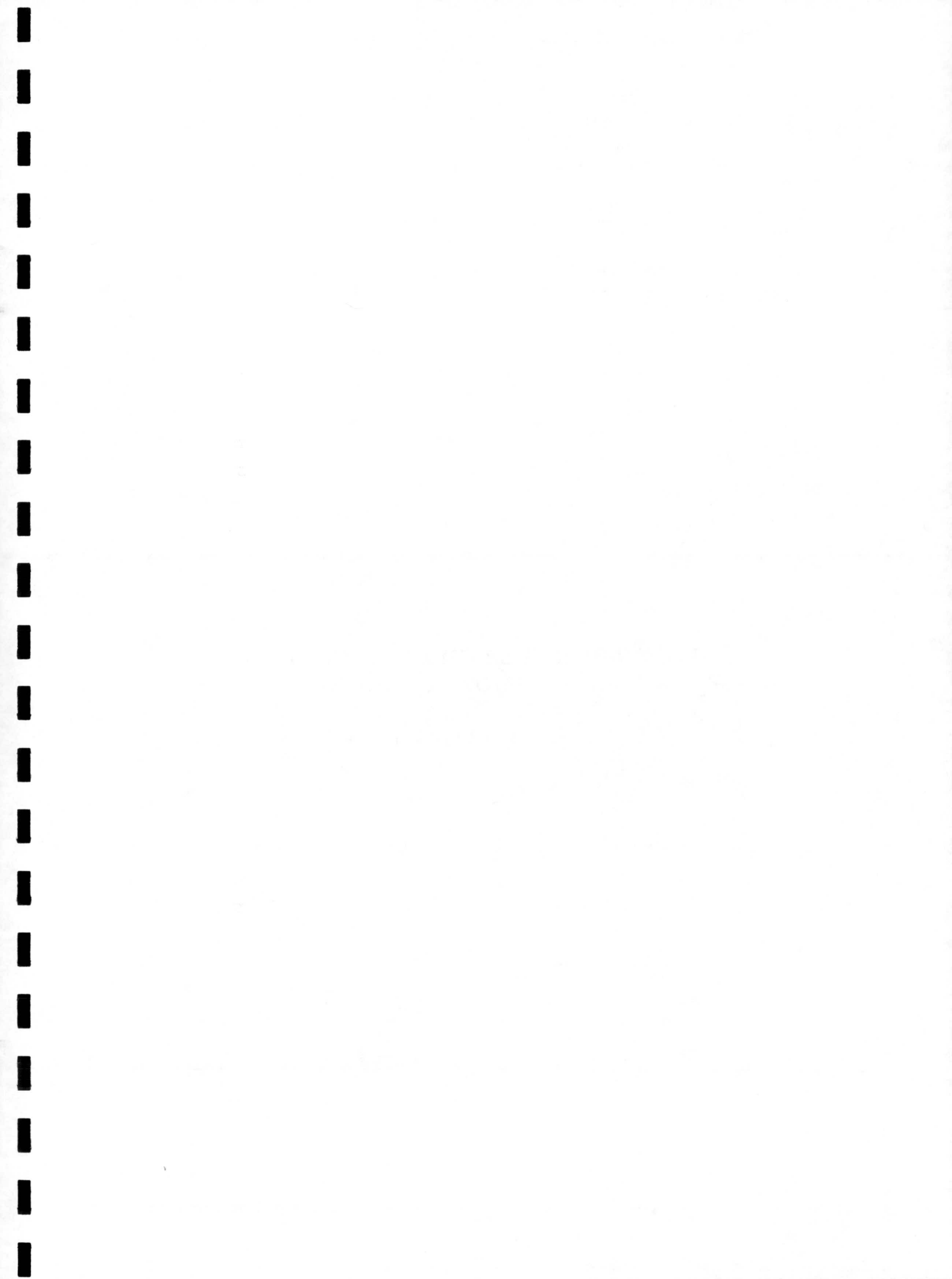
Figura 5.16.- Ejemplo de cromatograma HPLC-DAD de una muestra real de tomate en el que se encontró Metiocarb sulfóxido (1), Imidacloprid (3) y Metiocarb (7).



**CAPITULO VI**

**DETERMINACION DE BENZOILFENILUREAS (BPUS) EN  
MATRICES VEGETALES POR HPLC-DAD.**







## CAPITULO VI

### DETERMINACION DE BENZOILFENILUREAS (BPUS) EN MATRICES VEGETALES POR HPLC-DAD.

#### 6.1 INTRODUCCION.

Dentro del desarrollo de nuevos pesticidas es importante citar aquellos que modifican de forma importante los mecanismos de acción. Los pesticidas OPs y carbamatos actúan inhibiendo la acción de la enzima acetilcolinesterasa lo que supone un peligro potencial para todos los seres vivos. Las benzoilfenilureas en cambio presentan un mecanismo de actuación diferente cuyo punto de ataque no es el sistema nervioso, sino el caparazón de los animales. El uso de BPUs produce una perturbación en la formación de la quitina, elemento esencial para el desarrollo del caparazón de los insectos. Este hecho comporta una concentración sustancial de su efecto biológico en aquellos organismos que disponen de un caparazón que contiene quitina dando lugar a insecticidas más selectivos e inocuos.

No obstante, es necesario un riguroso estudio analítico de estos compuestos debido a otros posibles efectos que puedan tener o a la formación de productos de transformación de efectos indeseables. Por otro lado, las BPUs son compuestos de aplicación forestal principalmente aunque en España y especialmente en la provincia de Almería se están empezando a usar en hortalizas, por lo que su control, al no estar autorizado su uso en otros países, se hace necesario.

En cuanto a las propiedades físico-químicas de este grupo de compuestos, es de destacar su carácter apolar, que da lugar a una baja solubilidad en agua y su elevada presión de vapor que hace inviable su análisis por GC (ver Tabla 6.1).

*Pesticidas estudiados en este trabajo.* Se han seleccionado dentro de este grupo de compuestos aquellos de uso más corriente en los cultivos de la provincia de Almería. Las fórmulas de tales compuestos se recogen en la Fig. 6.1.

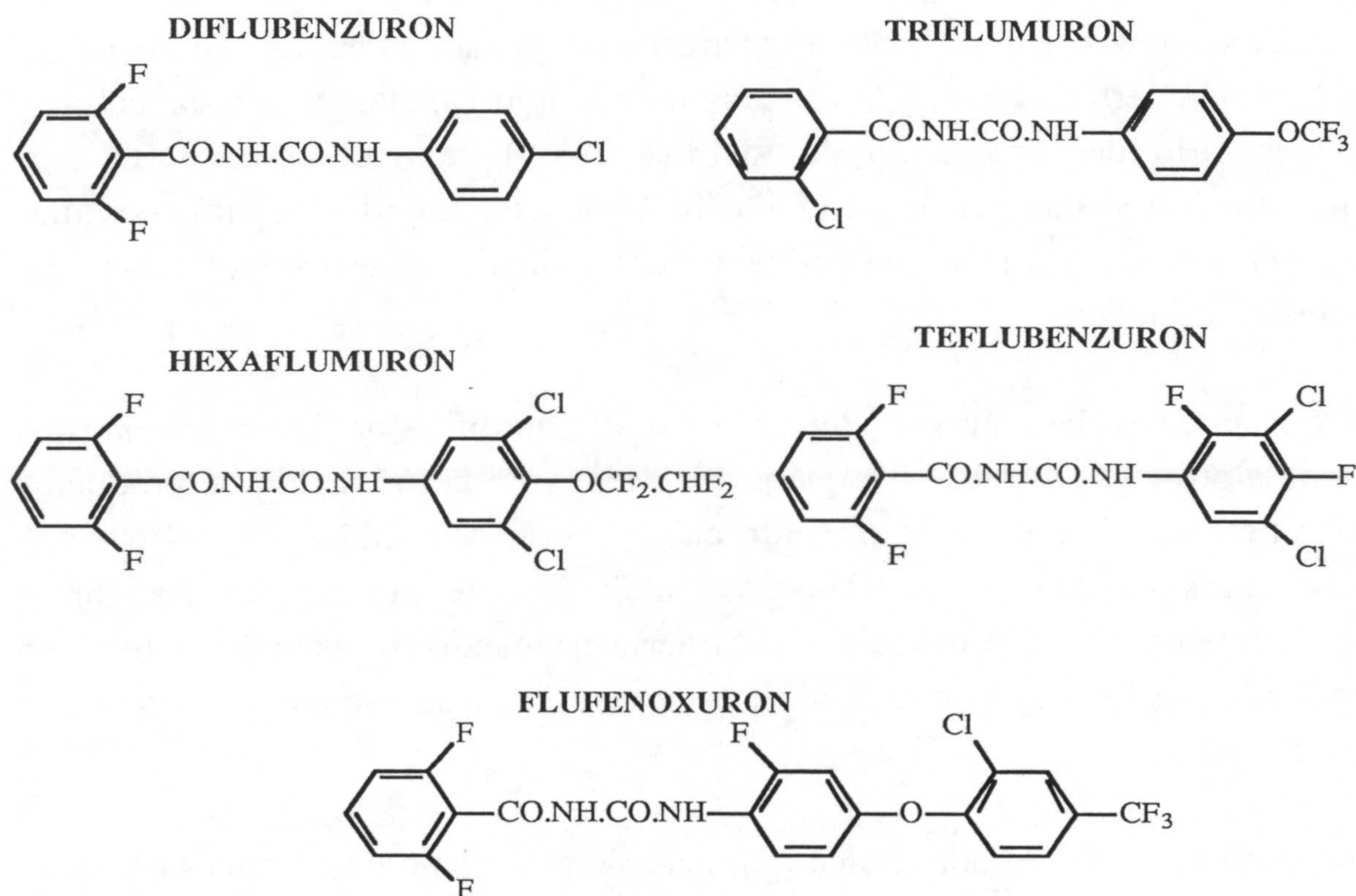


TABLA 6.1

*Solubilidad en agua y presión de vapor de las BPUs estudiadas*

Compuesto	Solubilidad en agua* (mg/L)	PV (20-25°C)* (Pa)
Diflubenzuron	$8,0 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-7}$
Triflumuron	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-10}$
Hexaflumuron	$2,7 \times 10^{-2}$	$5,9 \times 10^{-5}$
Teflubenzuron	$1,9 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-10}$
Flufenoxuron	$7,0 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^{-15}$

\* Según "The Pesticide Manual"

*Figura 6.1.- Estructura de las BPUs estudiadas.*

*Análisis.* La bibliografía encontrada para este grupo de pesticidas es muy escasa. Los métodos suministrados por las casas comerciales que los fabrican son métodos laboriosos que incluyen varios pasos de clean-up y múltiples evaporaciones seguidas de un análisis por HPLC debido a su imposibilidad de



analizarse por GC. W.A. Hopkins y D.R. Lauren (79) han desarrollado un método más sencillo pero aplicado a un único pesticida, Flufenoxuron, y en un limitado número de matrices (manzana y kiwi). Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha ningún método multiresiduos que incluya a varios de estos compuestos. Este ha sido el objetivo de nuestro estudio.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

11 JUL. 1995

COMISION DE DOCTORADO

## 6.2 METODOS EXPERIMENTALES.

### 6.2.1.- Análisis cromatográfico.

Estudiamos el análisis de estos compuestos mediante HPLC-DAD en fase reversa. Se utilizó una columna de sílica químicamente enlazada con C-18 (4 x 125 mm) provista de precolumna también de C-18 (4 x 4 mm). A continuación describiremos la fase móvil seleccionada para la separación así como los criterios de identificación utilizados, en matrices vegetales.

#### 6.2.1.1.- Separación y detección.

Se seleccionó como fase móvil una mezcla de AcN:agua. Su composición se programó en el tiempo con el siguiente gradiente, que abarca un amplio rango de polaridad:

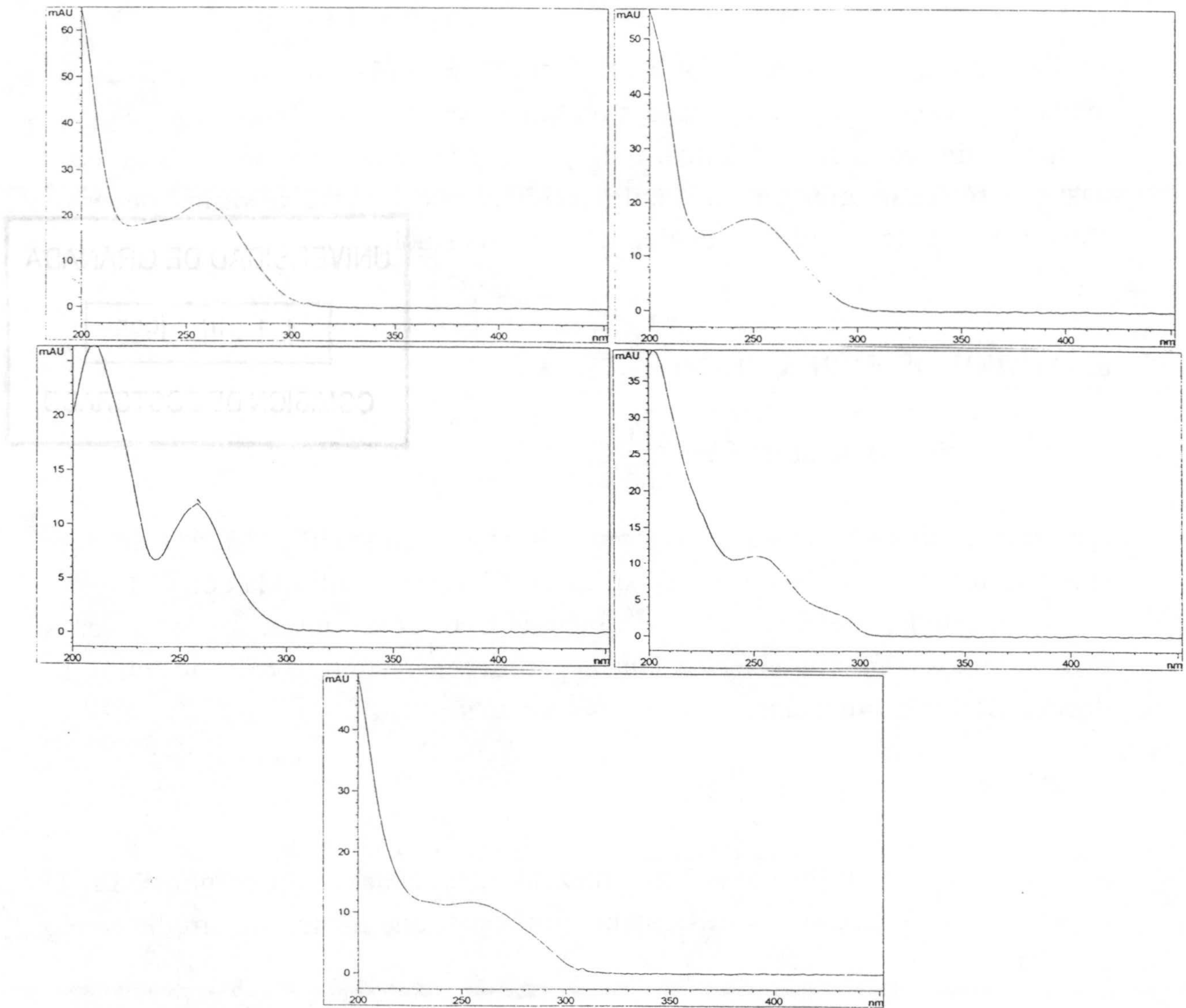
Fase móvil:	<u>Tiempo</u>	<u>Conc. AcN</u>
	0 min	25%
	2 min	25%
	12 min	90%
	15 min	100%

Tiempo de equilibración: 5 min.

Flujo de fase móvil: 1 mL/min.

El uso de detector de diodos nos permitió obtener cromatogramas a diferentes longitudes de onda. Las longitudes de onda seleccionadas inicialmente fueron las correspondientes a los máximos de absorción de éstos compuestos a 210 y 250 nm. Los espectros UV de los pesticidas estudiados obtenidos en el rango de 200 a 500 nm se muestran en la Fig. 6.2.





*Figura 6.2.- Espectros UV obtenidos para: Diflubenzuron (A), Triflumuron (B), Hexaflumuron (C), Teflubenzuron (D) y Flufenoxuron (E).*

#### 6.2.1.2.- Criterios de identificación.

La identificación de estos compuestos se basó no sólo en los TR sino también en el espectro UV obtenido de cada uno de ellos. Para ello se contó con una librería de espectros previamente elaborada por nosotros en la que se almacenaron, usando el programa HPLC<sup>3D</sup> Chemstation (Serie II), los espectros de cada uno de estos compuestos obtenidos en las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas. Para ello se utilizaron patrones de cada plaguicida de concentración elevada. Los espectros se almacenaron en memoria en las siguientes condiciones:

Rango de espectro: 200-500 nm



Número de puntos: 5

Suavizado: 10

De esta manera los espectros de los picos obtenidos a los TR de estos compuestos en las muestras eran normalizados y comparados con los espectros almacenados en librería, procediéndose a su identificación en función del nivel de concordancia de espectros asignado (e.m.).

### **6.2.2.-Método de extracción.**

Se desarrolló un nuevo método de extracción que fue aplicado, sobre muestras de laboratorio, obtenidas según la Directiva CE 79/700 (81), de pimiento fortificadas a dos niveles de concentración, de la siguiente forma:

Se parte de 10 g de muestra previamente triturada y homogeneizada, a los que se añaden 10 mL de AcN. La muestra es sometida a agitación y sonicación durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se decanta sobre un filtro de papel. La muestra es extraída dos veces más con 10 mL de una mezcla AcN:Agua (10:90) siguiendo el mismo procedimiento.

### **6.2.3.-Preconcentración y clean-up del extracto.**

Se desarrolló un método de limpieza del extracto y preconcentración de la muestra utilizando columnas desechables de EFS de sílica, químicamente enlazadas con C-18, comercialmente disponibles.

*Acondicionamiento de las columnas.* Antes de su uso, las columnas fueron acondicionadas con 6 mL de metanol y 6 mL de una mezcla de AcN:Agua en la misma proporción en que se encuentran los extractos vegetales obtenidos mediante el método descrito (40:60).

*Volumen de rotura.* Se estudió fortificando, con la mezcla de plaguicidas de interés a nivel de 0.3 mg/kg, extractos de pimiento preparados en AcN:Agua con distintos porcentajes de AcN (40%, 60% y 80%). Se eluyeron a través de las minicolumnas de extracción volúmenes entre 5 y 50 mL (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mL) de estos extractos que fueron recogidos, filtrados y analizados por HPLC.



*Elución.* Se estudió la elución con AcN de los pesticidas retenidos en la minicolumna tras pasar por ella un extracto al 40% de AcN en agua fortificado con la mezcla de pesticidas a 0.3 mg/kg. Para ello se eluyó con sucesivas porciones de 1 mL de este disolvente que eran filtradas y analizadas separadamente por HPLC.

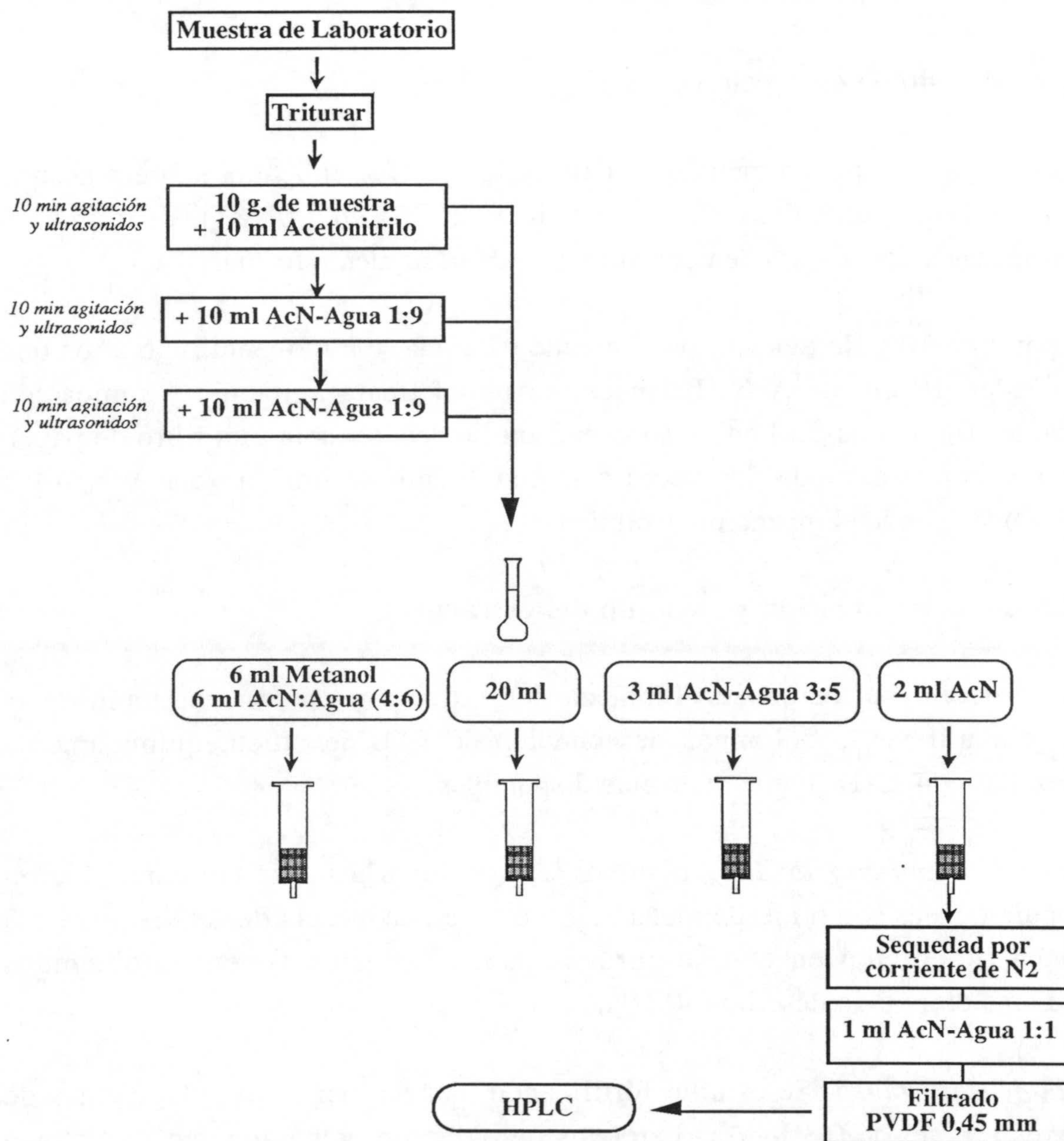


Figura 6.3.- Esquema del método de extracción.



*Clean-up.* Se estudió la posibilidad de obtener extractos más limpios mediante el lavado de los cartuchos. El lavado consistía en pasar por la columna de extracción, una vez eluída la muestra y antes de la elución de los pesticidas, cierto volumen de una disolución de lavado seleccionada de forma que la mayor parte posible de las interferencias de matriz fuesen arrastradas sin pérdida de los pesticidas retenidos. Se probaron diferentes soluciones de lavado como agua, agua/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, agua/acetona y diferentes mezclas de AcN:MeOH:Agua y AcN:Agua. Una vez lavado, el cartucho se deja secar durante dos minutos mediante vacío, procediéndose seguidamente a la elución.

El extracto final se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno y se recompone con 1 mL de AcN:Agua al 50%. La muestra una vez filtrada por un filtro de PVDF de 0.20 µm está lista para su análisis por HPLC.

Un esquema del método completo se ha representado en la Fig. 6.3.

#### 6.2.4.-Estudios de validación del método.

La validación del método consistió en el estudio de la precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación y selectividad del método. Tales estudios se realizaron de la forma ya descrita en el capítulo 3.2.3 con excepción del cálculo del límite de detección que se realizó en base al criterio de identificación aplicado a estos compuestos, consistente en la obtención del nivel de coincidencia entre los espectros de los picos en las muestras y los espectros almacenados en librería. De esta forma se asignaba como límite de detección el valor de concentración más pequeño capaz de proporcionar un valor de coincidencia de espectros mínimo, necesario para una identificación positiva del compuesto. Se calculó preparando extractos de pimiento contaminados con la mezcla de pesticidas en concentraciones decrecientes que se analizaron por HPLC-DAD.

Para el estudio de recuperación del método se fortificaron muestras de pimiento (10 g) con alícuotas de 0.3 y 1.0 mL de la disolución de contaminación descrita en el apartado 2.3.4, resultando niveles de contaminación de 0.09-0.10 y 0.30-0.33 mg/kg.

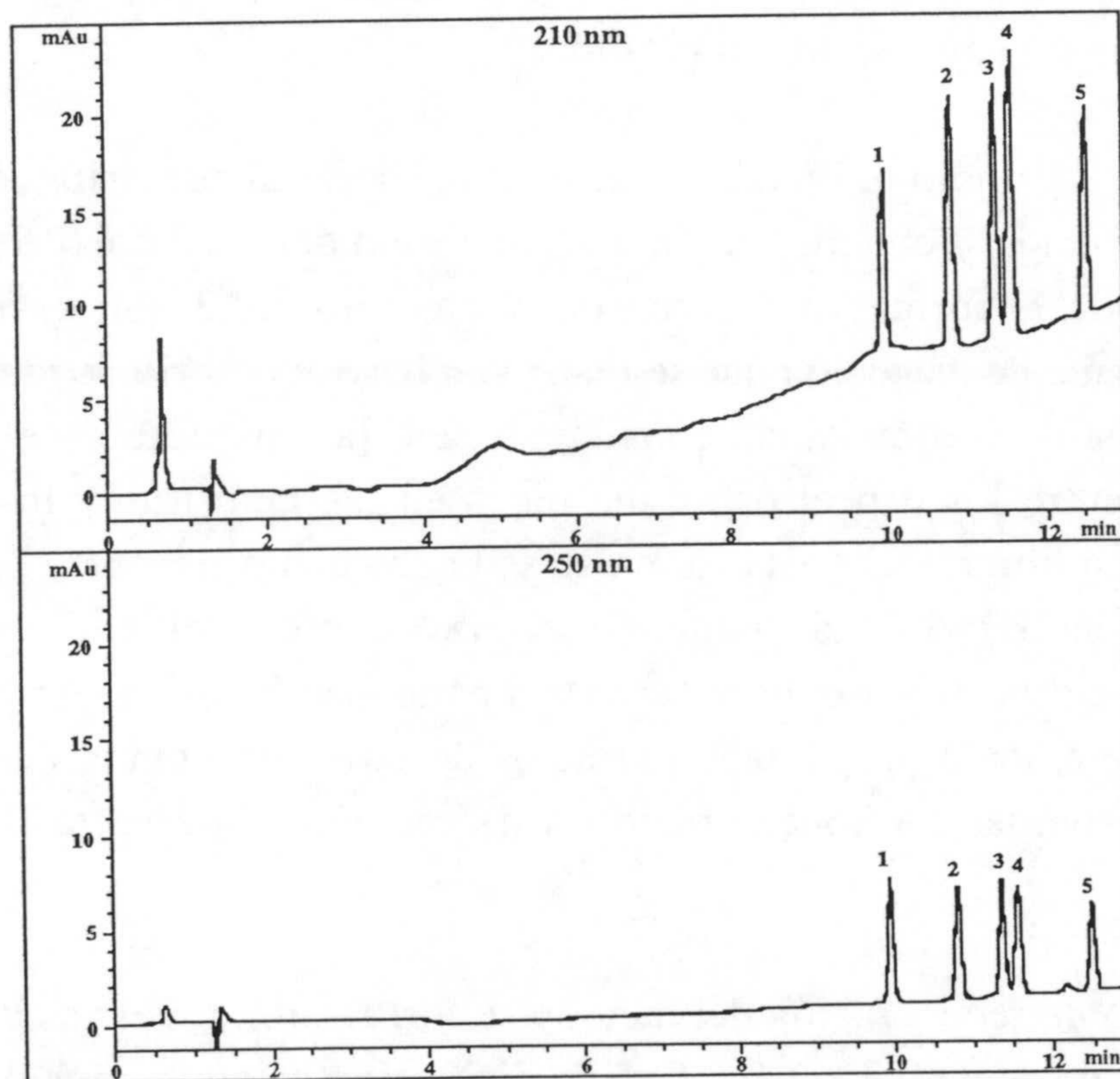
El efecto matriz se estudio sobre muestras de pimiento, tomate y pepino.



### 6.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

#### 6.3.1.- Separación cromatográfica e identificación.

La aplicación del gradiente seleccionado resultó en un cromatograma como el que se muestra en la Fig.6.4. Las benzoilfenilureas son compuestos apolares y, por tanto, fuertemente retenidos en una columna de relleno también muy apolar como es el C-18, por lo que es necesario utilizar una fase móvil con alto contenido en disolvente orgánico, acetonitrilo en nuestro caso. Los compuestos son así eluidos en el último tramo del gradiente resultando tiempos de retención altos (Tabla 6.2). El gradiente se mantiene, aún después de eluirse los compuestos, hasta un 100% de acetonitrilo durante unos minutos para eluir posibles coextractos procedentes de las muestras que hayan podido quedar retenidos en la columna.



*Figura 6.4.- Cromatograma HPLC-DAD de la mezcla de patrones de trabajo (1.00 ppm) a 210 y 250 nm. Los números sobre los picos corresponden con los de la Tabla 6.2.*



TABLA 6.2

*Tiempos de retención de los compuestos estudiados en las condiciones descritas.*

Nº	Compuesto	Tr (min)
1	Diflubenzuron	9.909
2	Triflumuron	10.739
3	Hexaflumuron	11.326
4	Teflubenzuron	11.526
5	Flufenoxuron	12.440

La respuesta del detector UV es fuertemente dependiente de la longitud de onda seleccionada. Si observamos los espectros de estos compuestos, Fig 6.2, vemos que hay una zona de máxima absorbancia próxima a 210 nm, sin embargo esta zona es muy poco selectiva. Gran número de compuestos y coextractos absorben a esa longitud de onda lo que podría dar lugar a interferencias al trabajar con muestras vegetales. Un segundo máximo, próximo a 250 nm parece ser una mejor elección. Aunque como se aprecia en la Fig 6.4 la sensibilidad del detector se reduce prácticamente a la mitad, la obtención de un menor ruido de fondo nos permitirá trabajar a atenuaciones más bajas y, por lo tanto, con límites de detección y cuantificación menores.

La posibilidad de obtener el espectro de cada pico en una muestra nos permitió utilizarlo como criterio eficaz de identificación. Así cada pesticida en las muestras era identificado en base a dos criterios: tiempo de retención y grado de concordancia de su espectro con el del patrón almacenado en librería (e.m.). Para calcular que valor mínimo de concordancia con el espectro de librería necesario para una identificación positiva del compuesto preparamos extractos de pimiento y los contaminamos con la mezcla de pesticidas en concentraciones cada vez más bajas realizándose el correspondiente análisis por HPLC-DAD. Aceptamos como límite de identificación positiva valores de concordancia de espectros iguales o superiores a 920. Las concentraciones más bajas que eran identificadas correctamente se consideraron como límite de detección del método. Tanto el límite de detección como los valores de e.m. obtenidos a ese nivel de concentración serán especificados más adelante (Tabla 6.4).



El tiempo total de análisis, considerando el tiempo utilizado para la limpieza y equilibración del equipo entre muestras, fue de 20 minutos lo que nos permitía analizar hasta un máximo de 72 muestras diarias. Esto tiene importancia de cara al uso de este método en análisis de rutina.

### 6.3.2.- Método de extracción y preconcentración.

En nuestro trabajo hemos desarrollado un método capaz de extraer estos compuestos con buenos resultados, con la ventaja de consumir una pequeña cantidad de disolvente (tan solo 12 mL de AcN para la extracción).

Se escogió AcN como extractante por ser un disolvente de probada eficacia, soluble en agua y capaz de disolver con facilidad los pesticidas estudiados. Se probaron diferentes mezclas de extracción hasta seleccionar la más adecuada cuyo contenido final era del 40% de AcN en agua. Porcentajes superiores de AcN dificultaban la preconcentración y porcentajes inferiores proporcionaban bajas recuperaciones.

*Preconcentración y clean-up.* El volumen de rotura de los cartuchos se calculó en extractos de pimiento para diferentes mezclas de AcN:Agua (40, 60 y 80%). Como ya se ha citado, porcentajes altos de AcN en los extractos disminuían la retención en las minicolumnas de EFS, proporcionando volúmenes de carga bajos que disminuían la preconcentración. Para el 40% de AcN se obtuvo el gráfico de elución representado en la Fig. 6.5. Se observó que empezaban a salir restos de los pesticidas menos retenidos (Diflubenzuron) a los 25 mL por lo que se escogió un volumen de carga de 20 mL que nos aseguraba la ausencia de pérdidas.

Se probaron minicolumnas de dos diferentes marcas comerciales (Whatman y Waters) y se comprobó que a pesar de ser ambas de C-18 y 500 mg se comportaban de forma diferente en cuanto a retención por lo que el volumen de rotura era diferente según los casos.



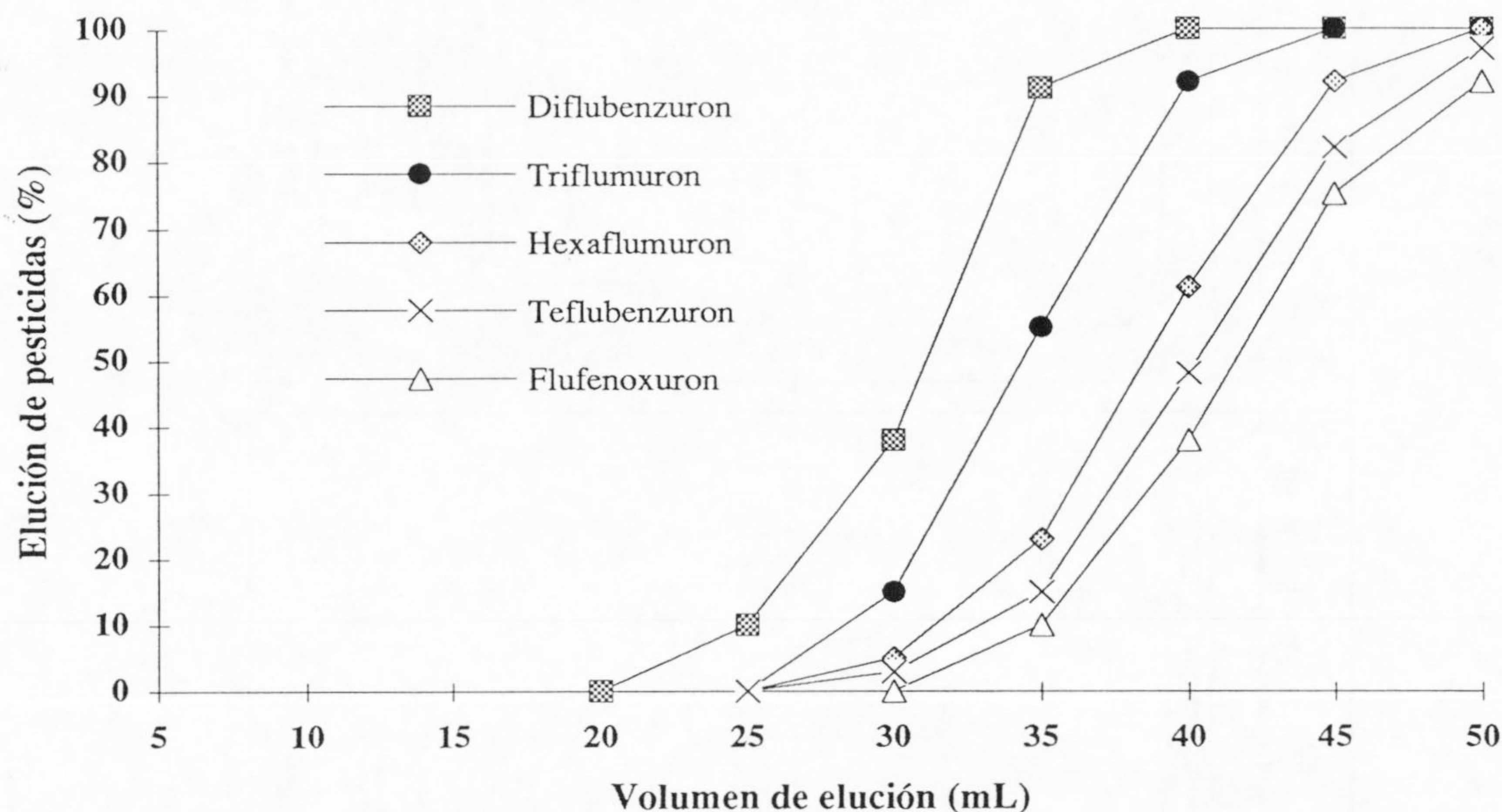


Figura 6.5.- Gráfico de volumen de rotura en minicolumnas de C-18 obtenido eluyendo extractos de pimienta preparados en AcN:Agua al 40%.

Con el fin de conseguir extractos más limpios, debido a que los extractos obtenidos eran fuertemente coloreados y se apreciaba la presencia de interferentes en todo el rango de polaridades, se estudió la eficacia de un lavado de la minicolumna de extracción previo a la elución de los compuestos de interés. Se probaron diferentes soluciones de lavado (agua, agua/ $H_3PO_4$ , agua/acetona y diferentes mezclas de AcN:MeOH:Agua) en diferentes volúmenes. En casi todos los casos la limpieza resultaba ineficaz o se producían pérdidas por elución de los pesticidas. La limpieza más eficaz se consiguió con 3 mL de una mezcla de AcN:Agua (3:5). En la Fig. 6.6 se representa un extracto de pimienta fortificado obtenido sin lavar (A) y lavando (B) la minicolumna con la solución descrita. Se aprecia claramente una reducción en la presencia de coextractos que no afecta a la recuperación de los compuestos.

La posterior elución de los pesticidas se llevó a cabo con AcN. Se comprobó que 2 mL de este disolvente eran suficientes para eluir completamente todos los pesticidas mientras que con 1 mL la elución de algunos compuestos como Flufenoxuron era inferior al 70%. El extracto final se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno y se recompuso con 1 mL de AcN:Agua al 50%. La muestra una vez filtrada era analizada por HPLC.



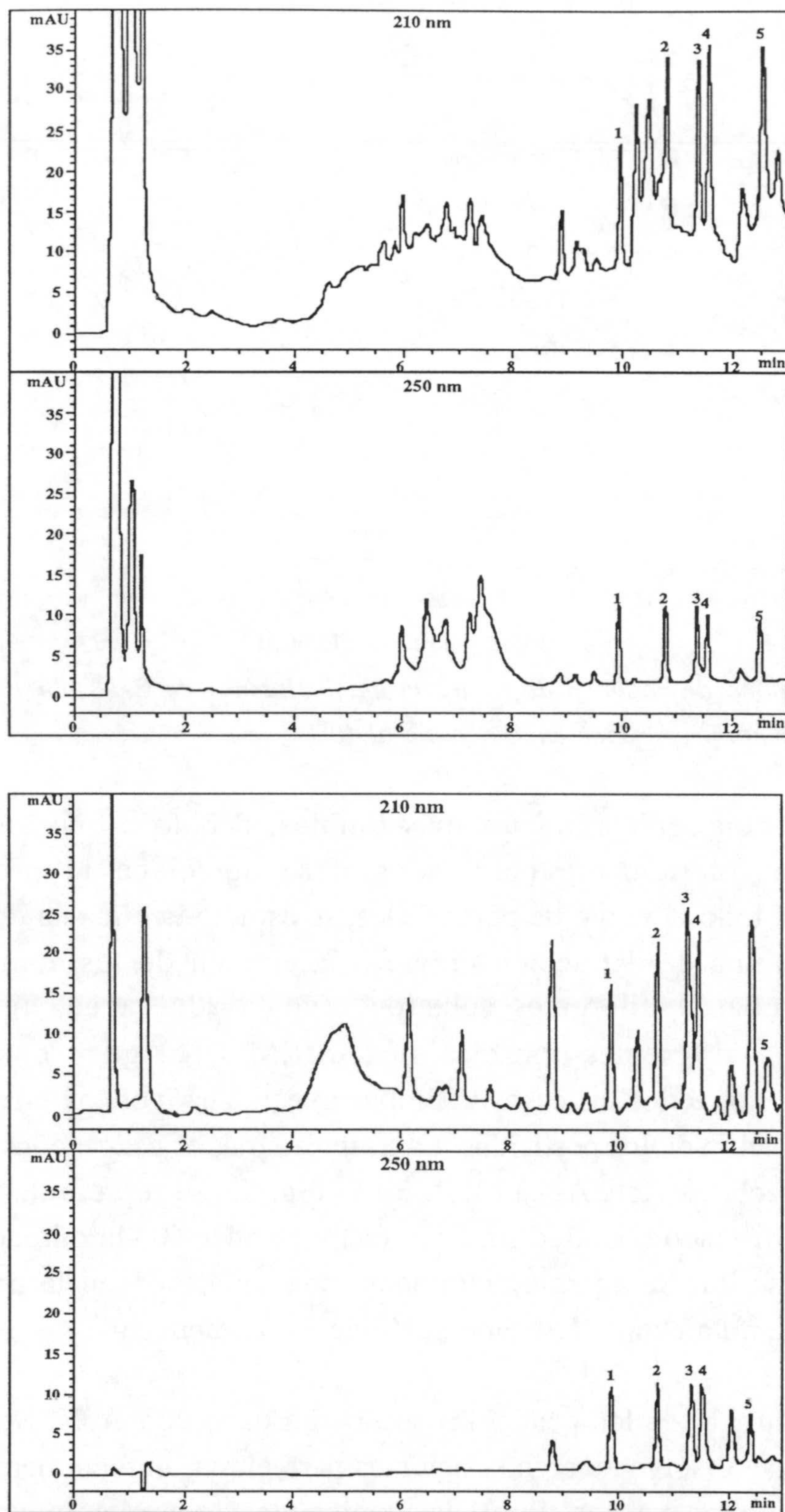


Figura 6.6.- Cromatograma HPLC-DAD correspondiente a una prueba de extracción de BPU en pimiento contaminado sin lavar (A) y lavando (B) el cartucho de C-18 con 3 mL de una mezcla AcN:Agua (3:5).



Los valores de concentración en mg/L obtenidos debían corregirse con un factor de 0.15 para expresarlos en mg de pesticida por kg de producto vegetal.

### 6.3.3.- Validación del método.

Se estudió la *precisión del método* calculando la repetitividad y reproducibilidad de los tiempos de retención y de las alturas de los picos a 250 nm (Tabla 6.3). Se escogió la medida de alturas para la cuantificación de los picos ya que la repetitividad, expresada en términos de coeficientes de variación, era peor en áreas, del 6.23% al 15.07%, que en alturas, del 2.09% al 8.77%. Cuando los análisis se realizaban en días diferentes los coeficientes de variación eran algo mayores, del 5.42% al 9.94%, pero en todos los casos fueron aceptables.

Los tiempos de retención fueron también muy repetitivos y reproducibles, con coeficientes de variación que, en el peor de los casos, no sobrepasaron el 0.48%.

TABLA 6.3

*Estudio de la precisión del método. Cálculo de la repetitividad y reproducibilidad, expresadas en términos de coeficientes de variación (%), de los tiempos de retención y alturas de pico de los compuestos estudiados.*

Compuesto	Repetitividad CV(%)		Reproducibilidad CV(%)	
	TR	Altura de pico	TR	Altura de pico
Diflubenzuron	0,38	2,09	0,25	5,42
Triflumuron	0,37	2,45	0,23	7,46
Hexaflumuron	0,20	5,99	0,32	6,41
Teflubenzuron	0,48	8,77	0,34	9,05
Flufenoxuron	0,10	2,40	0,26	9,94

Se estudió el *rango dinámico lineal* del detector entre 0.1 y 7.0 mg/L, lo que equivale a 2 y 150 ng en cantidad absoluta inyectada. Los coeficientes de correlación fueron buenos, superiores en todos los casos a 0.9989 excepto para



Teflubenzuron para el que decidimos aceptar un rango lineal algo más corto, de 2 a 80 ng.

Los límites de detección, obtenidos de la forma descrita en el capítulo 6.2.4, oscilaron entre  $2.7 \times 10^{-3}$  mg/kg para Hexaflumuron y  $9.1 \times 10^{-3}$  mg/kg para Flufenoxuron. El límite de cuantificación se fijó en 0.01 mg/kg en todos los casos. A este nivel los picos eran bien identificados al compararlos con la librería.

Los datos de rango lineal, coeficiente de correlación, límite de detección, límite de cuantificación y valor de concordancia de espectros obtenidos a la concentración correspondiente al límite de detección (e.m.) están recogidos en la Tabla 6.4.

**TABLA 6.4**

*Rango lineal, coeficiente de correlación, límite de detección, límite de cuantificación y nivel de concordancia de espectros (e.m.) de los pesticidas estudiados.*

Compuesto	Rango lineal (ng)	r	L.D. (mg/kg)	L.C. (mg/kg)	e.m.
Diflubenzuron	2,0-150,0	0,9997	0,0030	0,01	910
Triflumuron	2,0-150,0	0,9992	0,0085	0,01	920
Hexaflumuron	2,0-150,0	0,9998	0,0027	0,01	907
Teflubenzuron	2,0-80,0	0,9994	0,0070	0,01	918
Flufenoxuron	2,0-150,0	0,9989	0,0091	0,01	923

Los ensayos para determinar el grado de recuperación del método se realizaron sobre muestras fortificadas de pimiento a niveles de alrededor de 0.10 y 0.30 mg/kg. Las recuperaciones son similares para ambos niveles y oscilaron entre el 68-96% para el nivel más bajo y 71-85% para el más alto, correspondiendo la recuperación más baja al Flufenoxuron (ver Tabla 6.5). La reproducibilidad de la extracción fue buena en todos los casos, con coeficientes de variación entre el 2.70% y el 15.63%. La cuantificación se realizó mediante patrón externo. Los patrones de trabajo se preparaban diariamente.



TABLA 6.5

Recuperaciones medias ( $n=5$ ) y coeficientes de variación obtenidos en muestras de pimiento contaminadas a dos niveles de contaminación (0.10 y 0.30 mg/kg).

Compuesto	Nivel-1 (0.10 mg/kg)		Nivel-2 (0.30 mg/kg)	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Diflubenzuron	96,0	5,1	85,0	2,7
Triflumuron	77,0	6,5	83,0	5,0
Hexaflumuron	85,0	14,1	85,0	2,7
Teflubenzuron	72,0	10,7	80,0	5,7
Flufenoxuron	68,0	11,9	71,0	15,6

Se aplicó el método descrito a otras matrices como tomate y pepino. No se observaron en los blancos picos que pudieran interferir con los compuestos de interés. Así mismo se fortificaron muestras de ambas matrices con la mezcla de pesticidas y se comprobó la recuperación del método. Los resultados fueron similares en todos los casos como puede apreciarse en la Fig. 6.7 en donde se representan las recuperaciones medias obtenidas en dos extracciones de cada matriz fortificada con 0.3 mg/kg de cada compuesto. Se incluyen también las recuperaciones para pimiento.

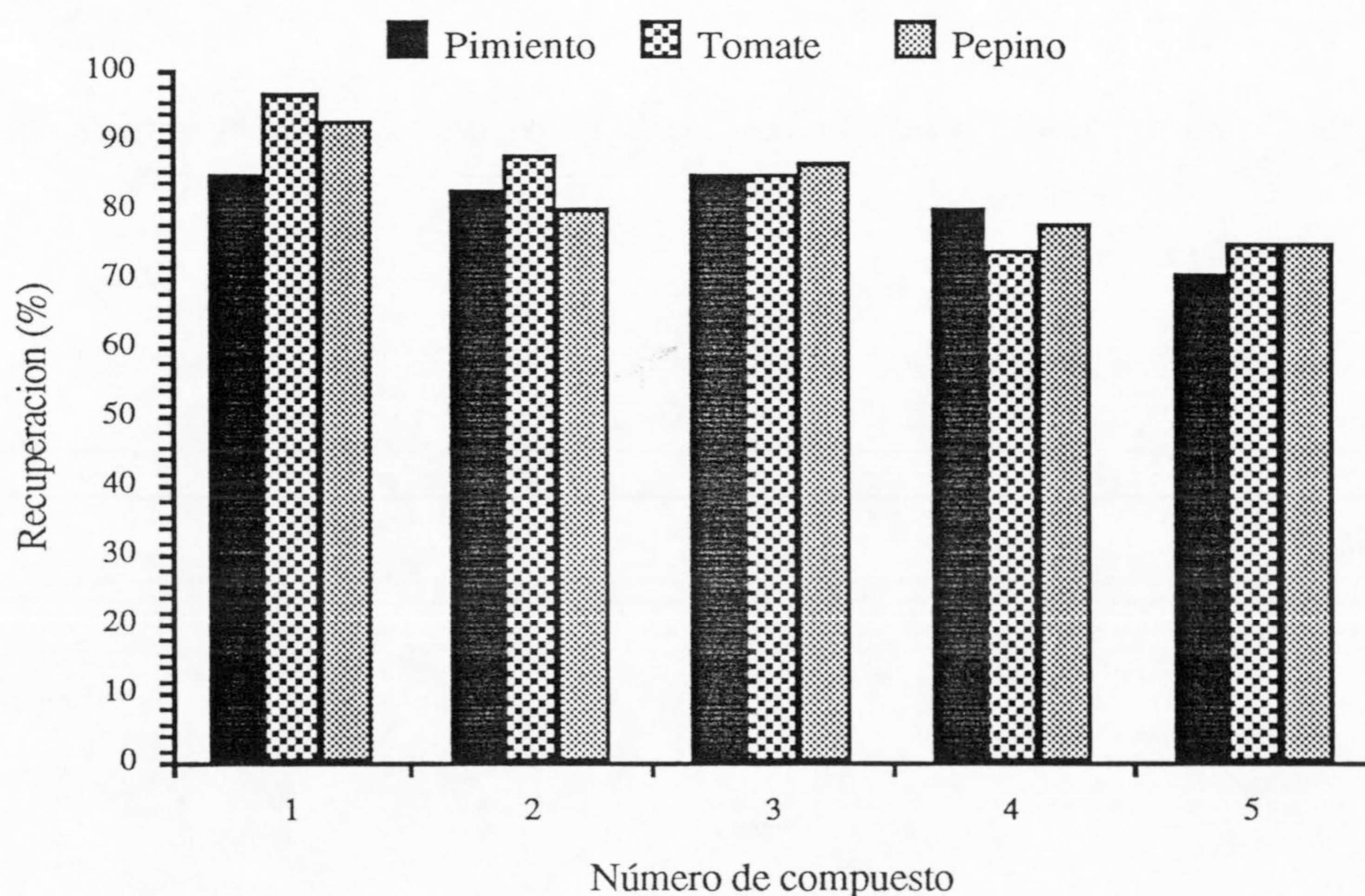
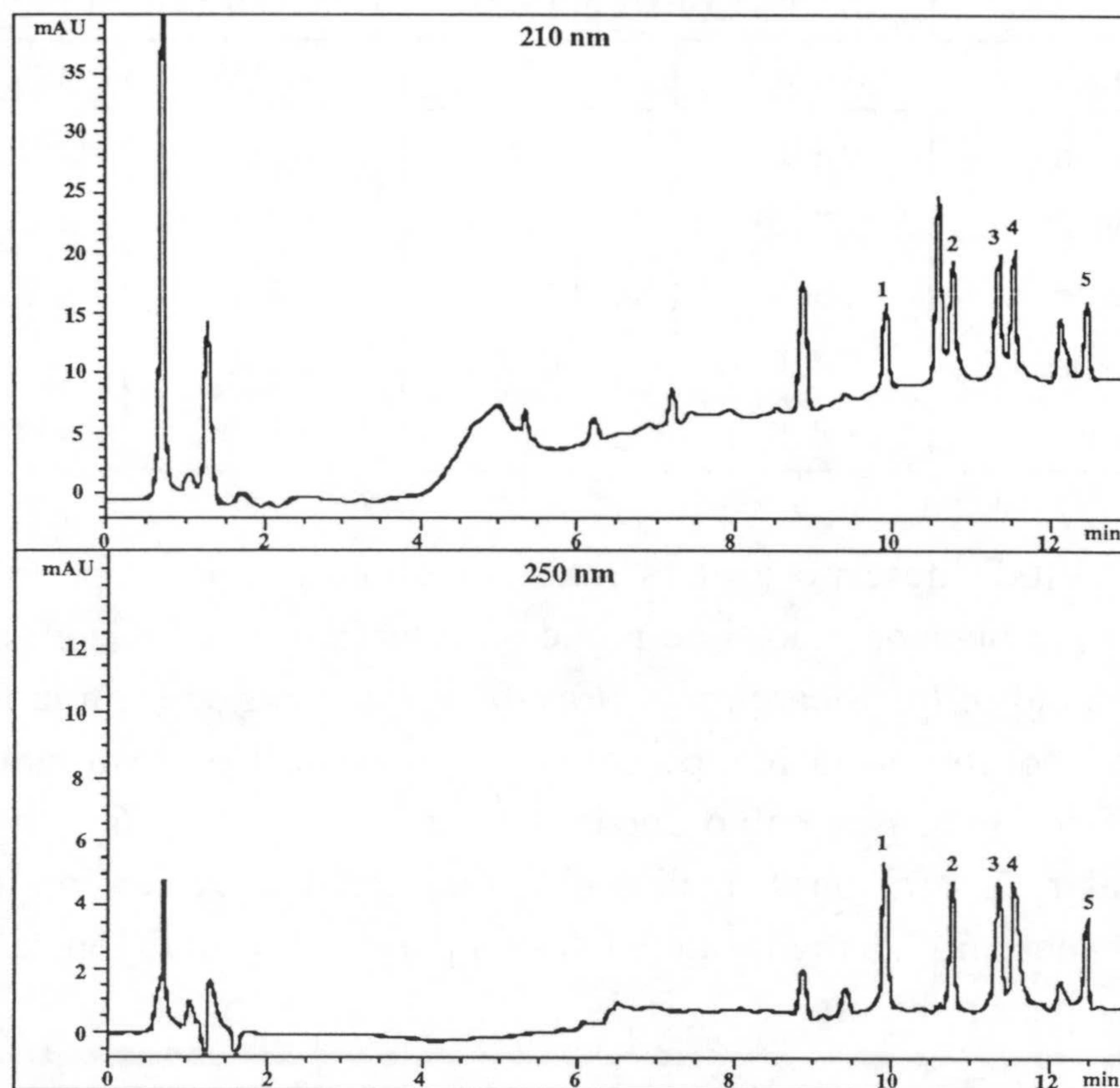


Figura 6.7.- Estudio del efecto matriz en las recuperaciones.



Los pesticidas fueron identificados correctamente en todos los casos y los extractos fueron limpios como se puede observar en el cromatograma correspondiente a una muestra de tomate representado en la Fig. 6.8.



*Figura 6.8.- Cromatograma correspondiente a la extracción de una muestra de tomate.*



**CAPITULO VII**

**ESTUDIO DE METODOS DE IDENTIFICACION POR GC-MS  
E INMUNOENSAYO.**







## CAPITULO VII

### ESTUDIO DE METODOS DE IDENTIFICACION POR GC-MS E INMUNOENSAYO.

#### 7.1 INTRODUCCION.

La Espectrometría de Masas (MS) se ha convertido en los últimos años en una técnica de aplicación a análisis de rutina, si bien su uso no está todavía generalizado. Esto supone un creciente interés, por parte de los laboratorios de control de pesticidas en hortalizas, de disponer de estos sistemas para su aplicación no solo como técnica de confirmación en casos concretos sino como un detector más de cromatografía de gases de aplicación en rutina en MMRs. Esto supondría una mejora de los resultados en cuanto a identificación y cuantificación, si bien este último aspecto presenta dificultades en cuanto a reproducibilidad con los equipos actuales.

Es de resaltar el gran potencial de identificación de este detector de GC frente a los habituales de un laboratorio, capacidad que está mejorando con la disponibilidad de librerías de plaguicidas comerciales (NIST y HP) que contienen un gran número de compuestos y el desarrollo de sistemas informáticos que permiten una identificación rápida de tales compuestos.

Sin embargo, a pesar de su gran potencial de identificación que evita los falsos positivos y negativos, la aplicación de este detector a MMRs proporciona límites de detección que están por encima de los valores requeridos por los LMRs.

Para determinados pesticidas o combinaciones pesticida/matriz es corriente la necesidad, por parte de los laboratorios de control, de disponer de límites de detección más bajos que los que reportan los MMRs en determinadas ocasiones. Esta situación se da en aquellos casos en que se requiere comprobar la ausencia total de un compuesto o compuestos determinados de uso prohibido. En estas ocasiones los MMRs deben complementarse con otros métodos más específicos o métodos individuales que se aplican a los compuestos que requieren el logro de esos objetivos.



Existen un gran número de estos métodos específicos recogidos en la bibliografía, para su aplicación a un compuesto o familias de compuestos, que se basan en reacciones de derivación o empleo de detectores más específicos o más sensibles. No obstante, la aplicación de tales métodos en el trabajo de rutina de un laboratorio está dificultada por su coste y requerimientos de instrumentación y de tiempo.

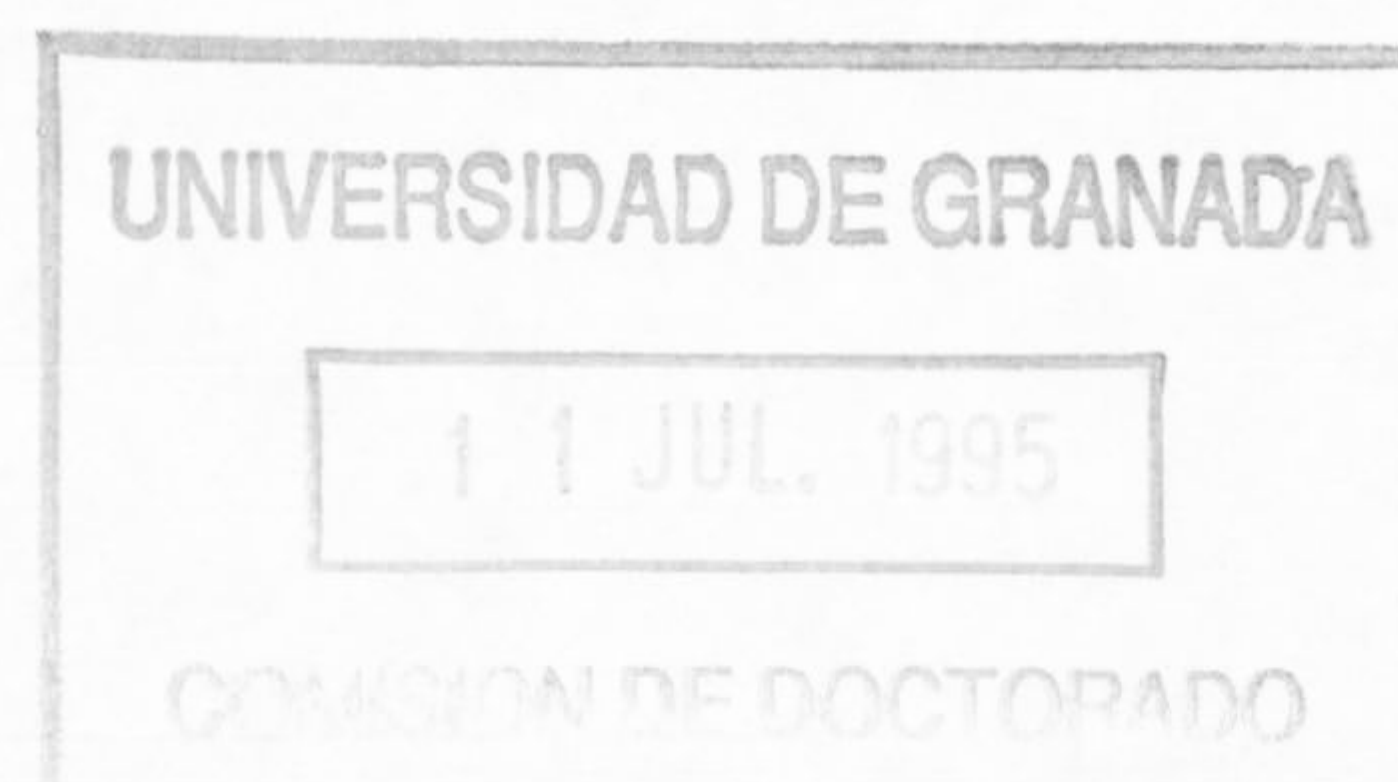
Estas dificultades pueden resolverse con el desarrollo de técnicas de análisis basadas en inmunoreacciones que son capaces de detectar, de forma rápida y sencilla, niveles de residuos de pesticidas del orden de ppb que cubran las necesidades de sensibilidad de cualquier compuesto (82,83). Si bien deben considerarse como técnicas de screening que requieren confirmación por métodos cromatográficos, su rapidez y sencillos protocolos de análisis hacen que su uso sea ventajoso frente a métodos cromatográficos individuales en el trabajo de laboratorio. Esto ha originado la aparición en el mercado de diversos ensayos de ELISA comerciales para pesticidas.

En el presente capítulo hemos desarrollado la aplicación de un ELISA competitivo comercial para el análisis de Procimidona, fungicida prohibido en países como EEUU (84) y Suiza (85) y de uso muy extendido en la provincia de Almería y en general en la costa mediterránea. El objetivo de esta aplicación ha sido disponer en nuestro laboratorio de un método rápido, sencillo y con límites de detección inferiores a 2 ppb que complementa al MMRs desarrollado.

## **7.2.- IDENTIFICACION DE PLAGUICIDAS OPs POR GC-MS.**

En este trabajo hemos demostrado la aplicabilidad de este detector para la identificación en rutina de los 25 plaguicidas OPs analizados con el método multirresiduos propuesto. Para ello se realizó, en primer lugar, un estudio previo de los fragmentos más característicos obtenidos para cada compuesto con el fin de determinar la estructura de tales iones. En segundo lugar se procedió a la selección de los fragmentos más adecuados para la elaboración del método en modo SIM. Por último, se aplicó el método propuesto al análisis de muestras de pimiento fortificadas con la mezcla de OPs para comprobar su eficacia y calcular el límite práctico de detección de cada compuesto.





### 7.2.1.- Estudio y asignación de iones.

Dado que los pesticidas OPs estudiados poseen estructuras comunes que pueden clasificarse en series, la asignación de iones se puede hacer en este caso de forma racionalizada, relacionando los iones  $(m/z)^+$  y abundancias obtenidas en cada una de las series. Tales especies comunes dan en ocasiones picos de intensidad importante que, en algunos casos, constituyen el pico base o son comparables a él. Así, la posibilidad de clasificar los pesticidas OPs en clases nos ha permitido sistematizar los resultados del análisis por GC-MS.

En la Tabla 7.1 se recogen las abundancias relativas de los principales iones y consta de dos partes, una en la que se recogen los fragmentos comunes a cada grupo (A) y otra en la que aparece el pico molecular y los fragmentos característicos correspondientes a las roturas más comunes (B).

Otros iones que aparecen en los OPs estudiados corresponden o a pérdidas de un grupo metilo en arylalquil derivados (compuestos aromáticos alquil-sustituídos)  $[M-CH_3]^+$ , como en el caso de Fenamifos, Mevinfos, Pirazofos y Pirimifos metil, o a pérdidas de un grupo OH en nitrocompuestos O-sustituídos  $[M-OH]^+$ , típica de Fenitroton.

Se observa que los picos del ión molecular  $[M]^+$  son bastante débiles ( $<10\%$ ) o pueden no aparecer en muchos casos, excepto para fosforados O,O-dimetil/dietil O-(aromático) no orto sustituídos en los que el pico del ión molecular es abundante ( $>35\%$ ). En el caso de sustituyentes en orto en anillos aromáticos la formación del fragmento de  $m/z [M-X]^+$  por pérdidas del grupo en orto es preferente (Clorpirifos metil 60%, Clorpirifos 47% y Clorfenfivos 44%)

Otro grupo importante de fragmentos resulta de la rotura del enlace -O-R' o -S-R' debido a la estabilidad del fragmento aromático (o heteroaromático) formado de la rotura de un enlace débil. Aparecen fragmentos a  $m/z$  180, 161, 197, 221, etc.

Finalmente aparecen una serie de iones diagnóstico típicos de estos OPs y característicos de cada grupo ( $m/z$  79, 81, 97, 109, 121, 125 y 127) que explicaremos a continuación.



TABLA 7.1

Abundancias relativas de los principales iones del espectro de masas de los OPs estudiados. En la parte A se recogen los fragmentos comunes a cada grupo y en B los iones característicos correspondientes a las roturas más comunes.

Compuestos O,O dimetil	PM	A					B						
		Abundancia (%) de los iones de m/z:					Abundancia (%) de los iones de m/z:						
		79	93	109	125	127	M	M-X a	M-47	M-157			
<u>Fosfatos</u>													
Diclorvos	220	20		100						4	18		
Mevinfos	224	12		19		100				4			
Naled	380	21		100						4	5		
Monocrotofos	223	9		13		100				4			
<u>Fosforotioatos</u>													
Ometoato	213	48			17					4			
Clorpirifos metil	321	35	21	25	100					36	60		
Etrimfos	292	71	55	43	100					45			
Fenitroton	277	36	24	79	100					57			
Pirimifos metil	305	40	60	44	100					35			
Paration metil	263	30	20	100	83								
<u>Fosforoditioatos</u>													
Dimetoato	229	19	78		80					16			
Malation	330	19	85		100					3		80	
Metidation	302	9	22		18					3		100	
<u>Otros</u>													
Acefato	183	12			14					4		100	
Metamidofos	141	14								39		100	



TABLA 7.1 (Cont.)

Continuación de la Tabla anterior para O,O dietil derivados.

Compuestos O,O dietil	PM	A					B				
		Abundancia (%) de los iones de m/z:					Abundancia (%) de los iones de m/z:				
		81	97	109	121	125	M	M-X a	M-28	M-56	MH-153/185
<u>Fosfatos</u>											
Clorfenvinfos	358	100		62		19		44	50		
<u>Fosforotioatos</u>											
Triazofos	313		55	9		10	17		10	19	100
Clorpirifos	349		47	12		22		47	29	40	100
Pyrazofos	373		31	8		9	19				100
Piridafention	340		100	26		44	44				52
<u>Fosforoditioatos</u>											
Mecarban	329		82		29	49	12				
Carbofenotion	342		61		53		15				100
Fosalone	367		46		59	21	9				100
<u>Otros</u>											
Fenamifos	303			12		9	69				



*Serie: Fosfatos. Derivados O,O dimetil/dietil.* Son característicos de este grupo de OPs los iones a m/z 79, 81, 109, 125 y 127 cuya composición es la siguiente:

<u>Derivados O,O-dimetil</u>	<u>Derivados O,O-dietil</u>
79 $[\text{CH}_3\text{O P OH}]^+$	81 $[(\text{OH})_2 \text{PO}]^+$
109 $[(\text{CH}_3\text{O})_2 \text{PO}]^+$	109 $[\text{EtO PO OH}]^+$
127 $[(\text{CH}_3\text{O})_2 \text{P (OH)}_2]^+$	125 $[\text{EtO PO}_2 \text{OH}]^+$

La abundancia relativa del ión de m/z 79 es menor del 22% en todos los casos estudiados. El ión m/z 109 es el pico base, excepto cuando existe un carbono secundario junto al átomo de oxígeno del enlace P-O. En estos casos (Mevinfos y Monocrotofos) el pico base es el ión de m/z 127 a expensas del ión 109 presumiblemente como consecuencia de la mayor estabilidad del carbocatión secundario.

El derivado dietílico, Clorfenvinfos, da el ión 81 como pico base y muestra también los picos 109 y 125 cuyas estructuras se basan en procesos de deetilación.

*Serie: O,S-Fosforotioatos. Derivados O,Odimetil/dietil.* Los iones característicos de este grupo están presentes en el espectro de masas de todos los compuestos estudiados. Aparecen picos a m/z 79, 93, 97, 109 y 125.

<u>Derivados O,O-dimetil</u>	<u>Derivados O,O-dietil</u>
79 $[\text{CH}_3\text{O P OH}]^+$	97 $[(\text{OH})_2 \text{PS}]^+$
93 $[(\text{CH}_3\text{O})_2 \text{P}]^+$	109 $[\text{EtO PO OH}]^+$
109 $[(\text{CH}_3\text{O})_2 \text{PO}]^+$	125 $[\text{EtO PO}_2 \text{OH}]^+$
125 $[(\text{CH}_3\text{O})_2 \text{PS}]^+$	

Los picos base son a m/z 109 o 125 en los fosforotioatos O,O-dimetil O-(aromático) estudiados (Clorpirifos metil, Etrimfos, Fenitrothion, Pirimifos metil y Paration metil). La formación de estos fragmentos típicos de pesticidas OPs con grupo fosforotioato es debida a la pérdida competitiva de RO- y RS- (Barcelo 19)

Los derivados O,O-dietil estudiados poseen un comportamiento diferente a los compuestos O,O-dimetil en cuanto a la intensidad de los picos comunes, 109 y



125. Esto es debido a que ocurre una mayor fragmentación de las especies  $[M]^+$  y  $[M-X]^+$  que incluyen la eliminación sucesiva de dos moléculas etileno del fosforil "moiety". Esto produce iones a  $m/z$  28 y 56 más ligeros.

En todos los espectros de los dietil-derivados estudiados se han observado nuevas disposiciones a  $m/z$  161, 197, 221 y 188 correspondientes a  $[MH-153]^+$  equivalente a pérdidas de  $[(EtO)_2PS]$ . Estos fragmentos tienen intensidades altas en los compuestos estudiados (52%) o son los picos base (Triazofos, Clorpirifos y Pirazofos).

*Serie: Fosforoditioatos. Derivados O,O dimetil/dietil.* Dan iones característicos a  $m/z$  79, 93, 97, 121 y 125. Su composición es la siguiente:

<u>Derivados O,O-dimetil</u>		<u>Derivados O,O-dietil</u>	
79	$[CH_3O P OH]^+$	97	$[(OH)_2 PS]^+$
93	$[(CH_3O)_2 P]^+$	121	$[(EtO)_2 P]^+$
125	$[(CH_3O)_2 PS]^+$	125	$[EtO PO_2 OH]^+$

El principal grupo de fragmentos de los O,O-dimetil fosforoditioatos estudiados son a  $m/z$  93, 125 y el ión del pico base a  $[M-157]^+$  excepto para Dimetoato. Este fragmento es equivalente a la pérdida de dimetil fosforoditioato  $[(MeO)_2PSS]^+$ . Comportamiento similar tienen los derivados O,O-dietil con iones dominantes a 97, 121 y 125 y el ión del pico base a  $[M-185]^+$ , excepto para Mecarbam. Este fragmento es producido por la pérdida del fosforoditioato correspondiente  $[(EtO)_2 PS S]^+$ .

#### *Otros organofosforados.*

Los otros compuestos estudiados son Acefato, Metamidofos y Fenamifos. Acefato y Metamidofos son O,S-metil derivados caracterizados por un ión de pico base correspondiente a  $[M-47]^+$  por pérdida del grupo S-metil. Otro ión diagnóstico para estos compuestos es el 79. Una diferencia de estos dimetil-organofosforados es que el ión  $m/z$  109 no está presente.

El Fenamifos muestra un fuerte ión molecular (69%) con un pico base a  $m/z$  154.



### 7.2.2.- Selección de iones para el análisis en modo SIM.

La selección de iones para la programación en modo SIM se realizó en base a dos criterios fundamentales, por un lado la abundancia del ión y por otro la selectividad de éste.

Los iones seleccionados para cada plaguicida fueron los de mayor abundancia con el fin de obtener una máxima sensibilidad. Se seleccionó un ión para cada plaguicida. En el caso de compuestos que presentaban una escasa sensibilidad se seleccionaron dos iones para aumentar ésta.

Para pares de picos mal resueltos, como Paration metil y Clorpirifos metil, es importante seleccionar iones característicos, que no sean comunes, lo que nos permitirá separarlos con un tratamiento de datos posterior. Así para el Paration metil se escogió el ión de  $m/z$  263, que corresponde al pico molecular, y para Clorpirifos metil el ión de  $m/z$  286. En la Tabla 7.2 aparecen los iones elegidos para cada compuesto.

### 7.2.3.- Aplicación del método en muestras vegetales. Cálculo del límite de detección.

Para comprobar la efectividad del método en muestras reales, se prepararon extractos de pimiento, que no contenían los pesticidas de interés, según el método descrito en el capítulo III. Se prepararon también dos disoluciones, A y B, que contenían, entre ambas, los pesticidas estudiados en concentraciones de 25-38 mg/L. El contenido de las disoluciones fue el siguiente:

Disolución A: Diclorvos, Mevinfos, Ometoato, Monocrotofos, Clorpirifos metil, Malation, Clorpirifos, Quinalfos, Mecarban, Fenamifos, Triazofos y Fosalone.  
Disolución B: Metamidofos, Naled, Acefato, Dimetoato, Etrimfos, Paration metil, Fenitroton, Pirimifos metil, Clorfenvinfos, Metidation, Carbofenotion, Piridafention y Pirazofos.

Dos porciones de 5 mL de extracto fueron contaminadas con 0.2 mL de la disolución A y de la disolución B respectivamente. Obtuvimos así concentraciones de los pesticidas en los extractos A y B de entre 1.0-1.5 mg/L, lo que correspondía a 0.2-0.3 mg/kg.



TABLA 7.2

TR de los pesticidas OPs estudiados obtenidos en su análisis por GC-MS en las condiciones citadas en el texto. Ión o iones seleccionados para su análisis en modo SIM y límite de detección obtenido con la aplicación del método seleccionado en muestras vegetales.

Nº	Compuesto	TR (min)	Ion seleccionado m/z	LD mg/kg
1	Metamidofos	5,35	94/141	0,100
2	Diclorvos	5,45	109/185	0,010
3	Naled	5,45	109/185	N.D.
4	Mevinfos	7,66	127	0,008
5	Acefato	7,85	94/136	0,010
6	Ometoato	10,40	110/156	0,020
7	Monocrotofos	12,14	127/192	0,020
8	Dimetoato	12,92	87/125	0,020
9	Etrimfos	14,86	181/292	0,020
10	Paration metil	16,06	263	0,010
11	Clorpirifos metil	16,10	286	0,005
12	Fenitrothion	17,13	277	0,010
13	Pirimifos metil	17,23	290	0,010
14	Malation	17,62	173	0,010
15	Clorpirifos	18,01	197	0,010
16	Clorfenvinfos	19,66	267	0,020
17	Quinalfos	19,73	146	0,010
18	Mecarbam	19,85	131	0,002
19	Metidation	20,20	145	0,020
20	Fenamifos	21,51	154/303	0,020
21	Triazofos	23,96	161	0,010
22	Carbofenotion	24,14	157	0,020
23	Piridafention	26,30	340/199	0,010
24	Fosalone	27,89	182	0,010
25	Pirazofos	29,16	221	0,007

Los extractos contaminados, en éter de petróleo, se llevaron a sequedad con corriente de Nitrógeno y se recompusieron en ciclohexano antes de la inyección en masas. Las muestras se analizaron en el rango de masas de 30-600 u.m.a. y en modo SIM con programación de iones (los seleccionados en la Tabla 7.2). Los cromatogramas obtenidos en el rango de masas completo presentaban muchas interferencias de matriz y la sensibilidad para algunos compuestos era escasa. Con el modo SIM se obtuvieron cromatogramas mucho más limpios y la sensibilidad aumentó de dos a seis veces según los compuestos. En las Fig. 7.1



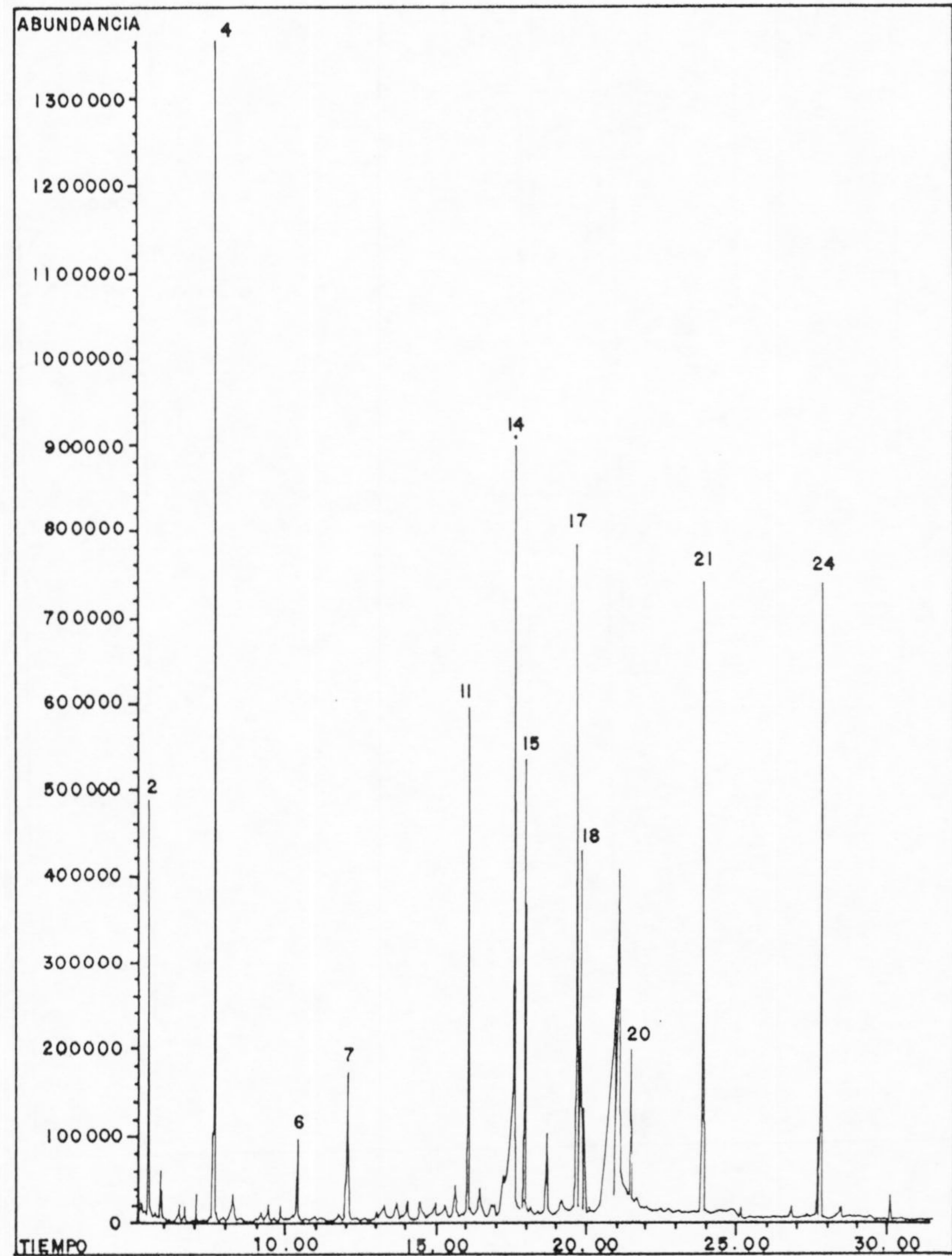
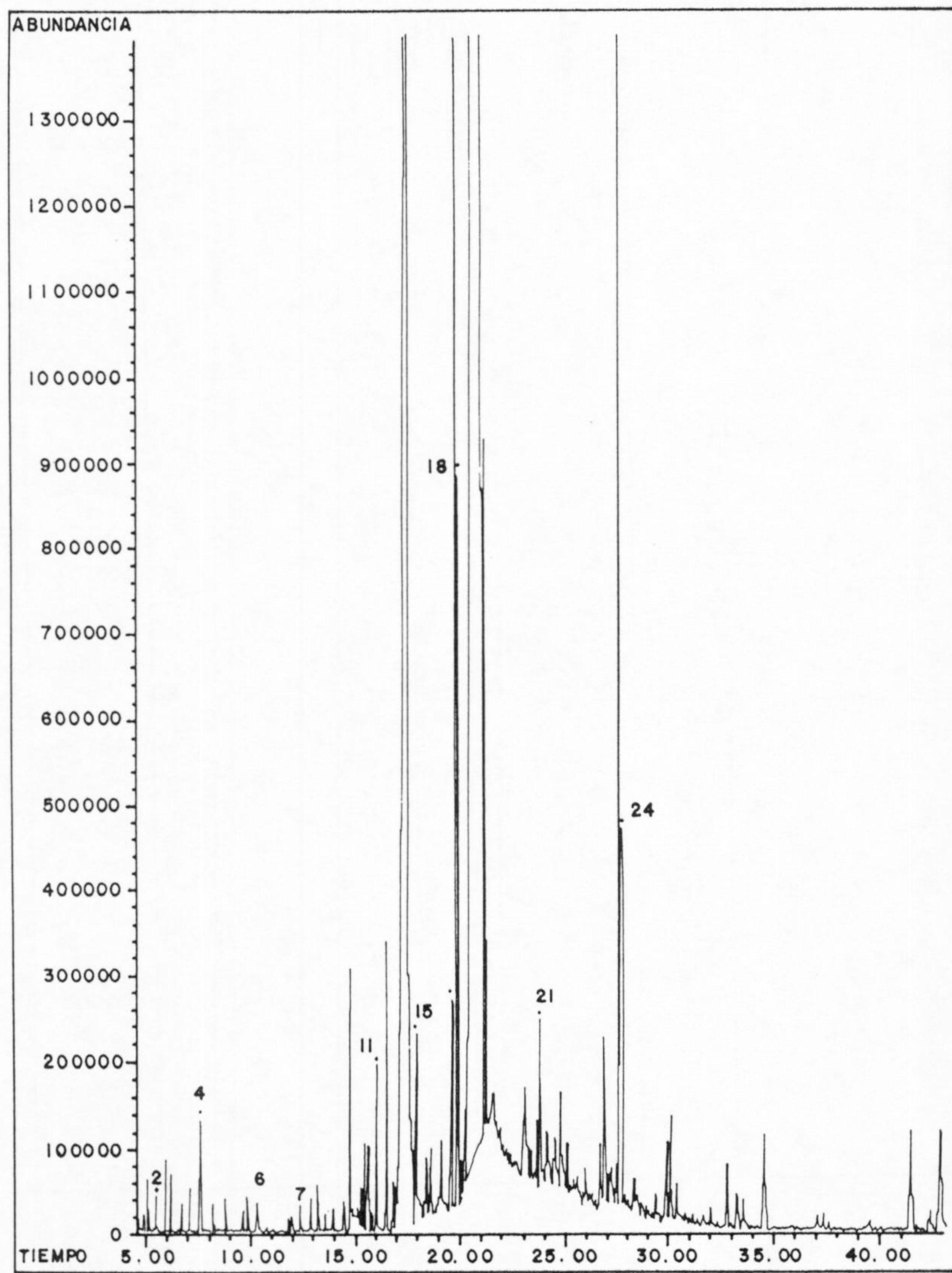
y 7.2 se representan los cromatogramas obtenidos en el rango de masas completo y en modo SIM para los extractos A y B.

En el extracto A y en el rango completo de masas la mayoría de los compuestos fueron identificados correctamente en base a la comparación con la librería si bien solo en cinco casos, Diclorvos, Mevinfos, Clorpirifos metil, Mecarban y Triazofos se obtuvieron niveles de identificación mayores del 70%. El resto se identificaron con niveles entre el 17-59% e incluso dos de ellos, Malation y Quinalfos no fueron reconocidos. Esto fue debido a la baja sensibilidad presentada por algunos de ellos (Ometoato y Monocrotofos) o a enmascaramientos con la matriz.

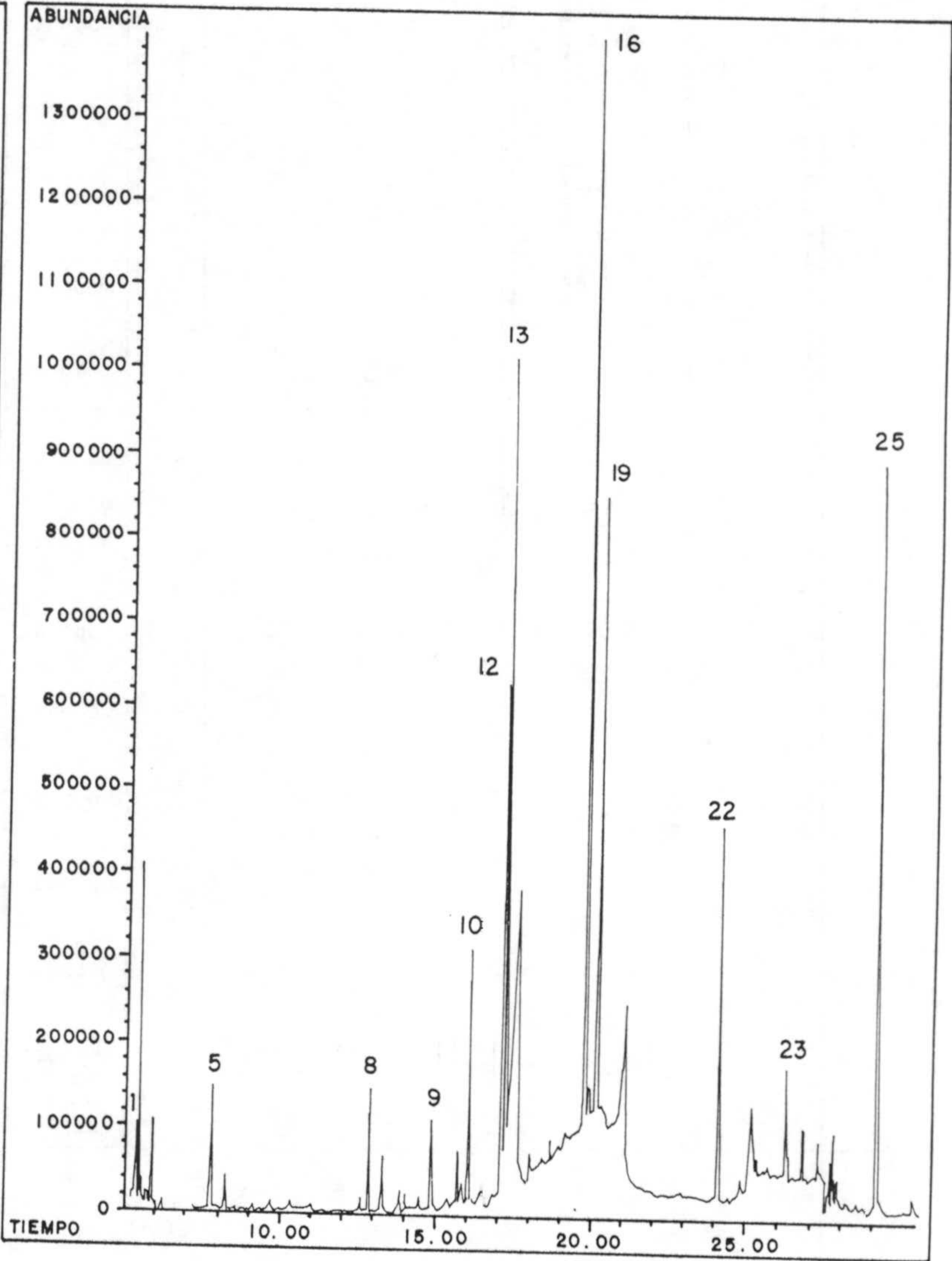
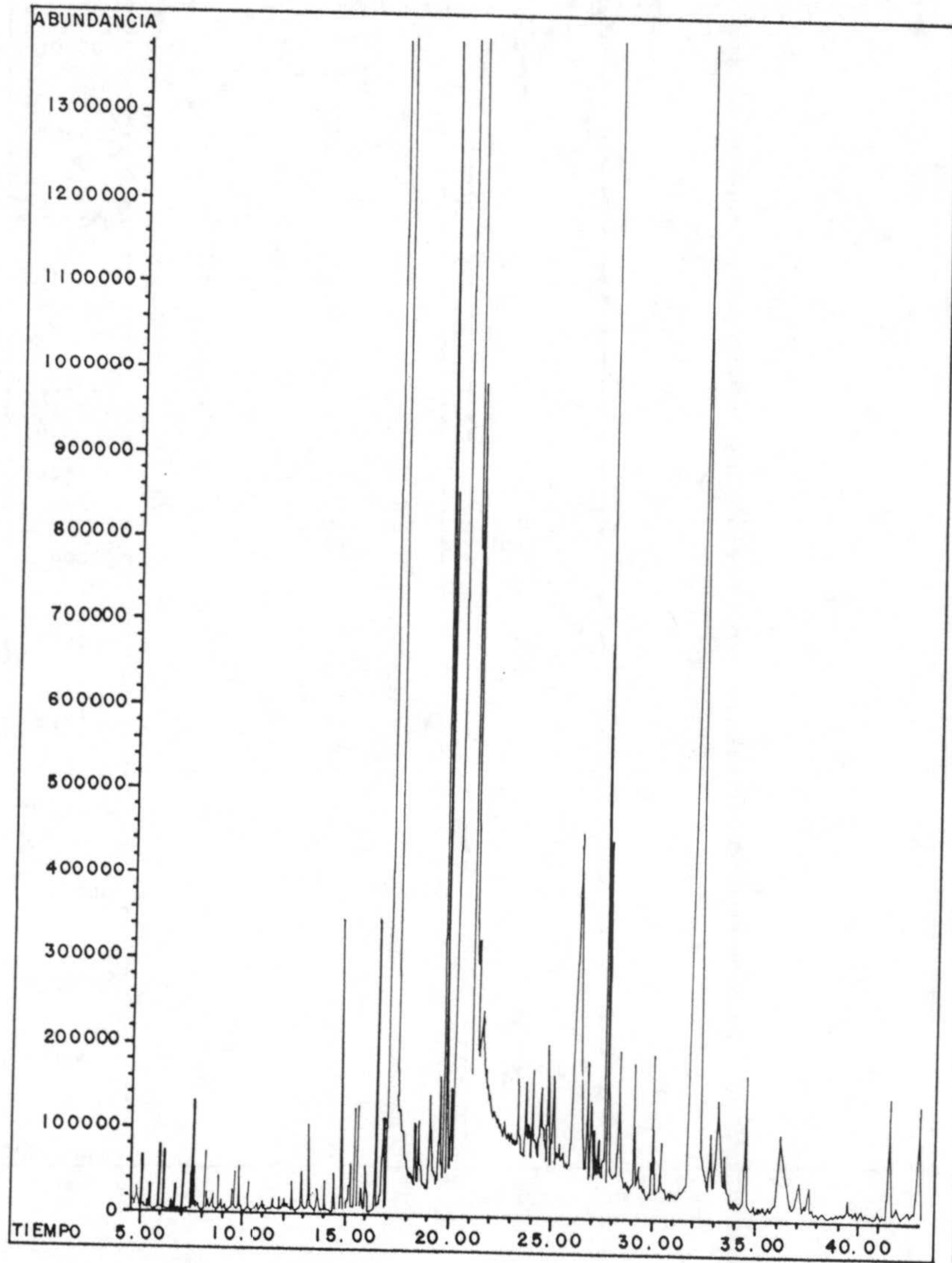
En modo SIM, en cambio, todos los compuestos se identificaron correctamente en base a los dos criterios seleccionados: tiempo de retención y presencia del ión o iones característicos, obteniéndose respuestas mayores para todos los picos y una reducción clara de las interferencias de matriz.

En el extracto B y en el rango completo de masas también fueron identificados correctamente, en base a la comparación con la librería, la mayoría de los compuestos aunque en este caso, solo dos pesticidas, Etrimfos y Fenitrothion, presentaron niveles de identificación mayores del 70%. El resto de los pesticidas se identificaron con niveles entre el 16-64% y tres de ellos, Naled, Acefato y Pirimifos metil, no fueron reconocidos bien por presentar muy baja sensibilidad (Acefato), por estar enmascarados con la matriz (Pirimifos metil) o bien, en el caso del Naled, por sufrir procesos de descomposición térmica en el inyector, que se han comprobado con estudios realizados con este compuesto individualmente. Este hecho se confirmó con la identificación de Diclorvos, producto de transformación del Naled, que no había sido añadido al extracto. Ambos compuestos poseen una estructura muy similar y el espectro de masas presenta los mismos picos con excepción del de  $m/z$  301 característico del Naled que corresponde a la pérdida  $[M-Br]^+$  y que aparece con una abundancia muy escasa.











El modo SIM, al igual que se vio con el análisis del extracto A, resultó más adecuado para el análisis de estos compuestos. Todos ellos se identificaron correctamente en base a los dos criterios seleccionados: tiempo de retención y presencia del ión o iones característicos. Se obtuvieron también respuestas mayores para todos los picos y una reducción importante de las interferencias de matriz.

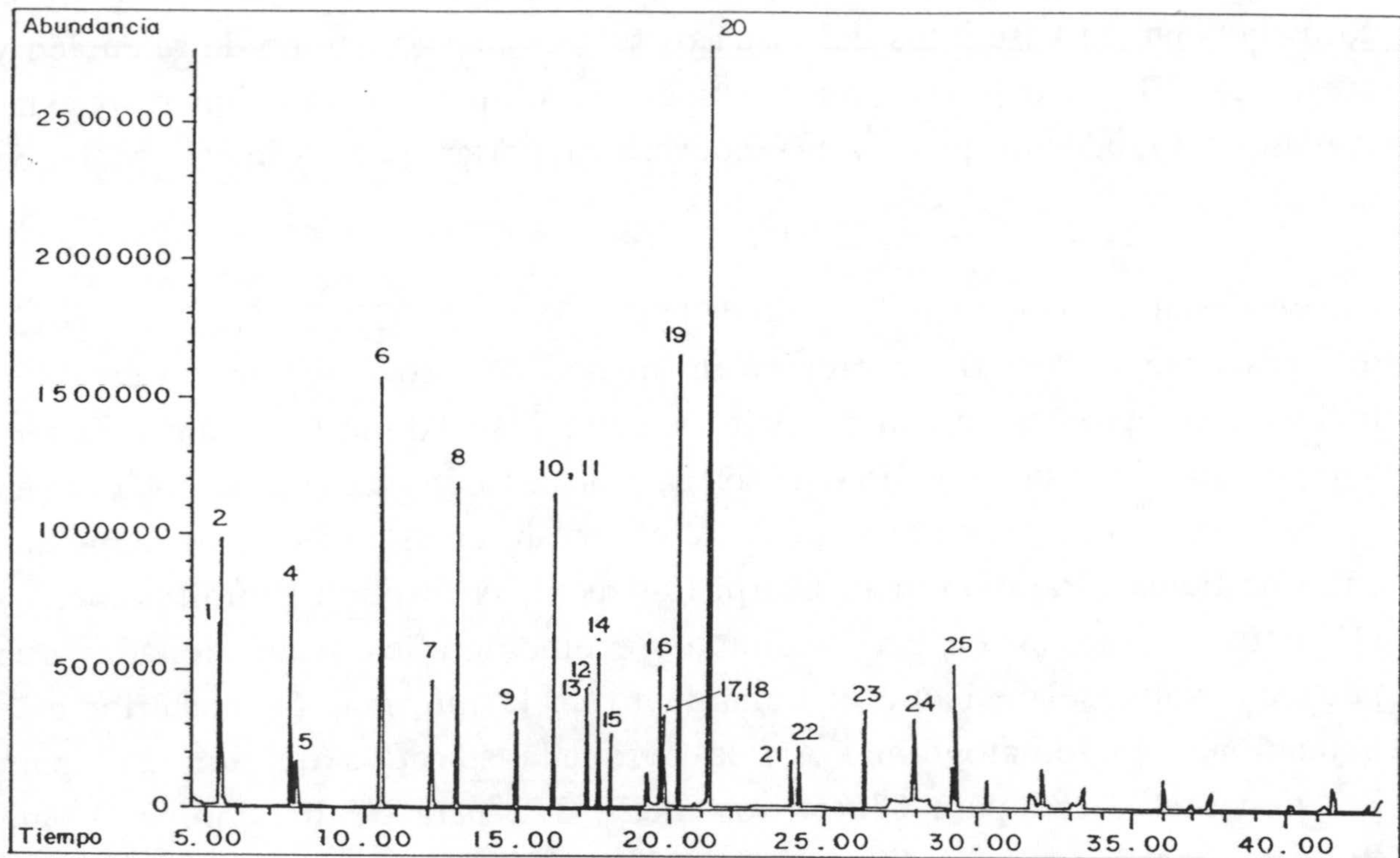
Una vez establecida la identificación de los 25 pesticidas OPs en GC-MS a partir de los extractos A y B, se preparó un nuevo extracto conteniendo esta vez todos los compuestos en concentraciones entre 2.0-10.0 mg/L, para estudiar su comportamiento cromatográfico de forma global. El cromatograma obtenido en modo SIM se muestra en la Fig.7.3. Se observan, en este caso, solapamientos entre pesticidas: Paration metil-Clorpirifos metil, Fenitrotion-Pirimifos metil y Quinalfos-Mecarban, en las condiciones cromatográficas seleccionadas que pueden resolverse mediante el tratamiento de la información posterior a la obtención del cromatograma. Así la búsqueda selectiva del ión 263 para Paration metil, 286 para Clorpirifos metil, 277 para Fenitrotion, 290 para Pirimifos metil, 146 para Quinalfos y 131 para Mecarban, puede resolver el problema tanto cualitativa como cuantitativamente.

También es de destacar la ausencia de Naled por descomposición de este compuesto como ya se ha comprobado.

A continuación se procedió al cálculo de los límites de detección del método propuesto para los pesticidas estudiados. Para ello se partió del extracto de pimiento fortificado ya descrito, que contenía entre 0.1 y 2.0 mg/kg de la mezcla de OPs, a partir del cual se realizaron sucesivas diluciones a fin de obtener el límite práctico de detección. Se realizó un estudio de blancos y se consideró como límite práctico de detección aquella concentración de pesticida que proporcionaba una respuesta 10 veces superior al ruido de fondo a su tiempo de retención.

Los límites de detección obtenidos se recogen en la Tabla 7.2 fueron adecuados, inferiores a los LMRs de los pesticidas, en la mayoría de los casos, del orden de 1 a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  como se recoge en la Tabla 7.2. Solo algunos pesticidas como Metamidofos (100 mg/kg) presentaron límites algo mayores.





*Figura 7.3.- Cromatograma GC-MS en modo SIM de un extracto de pimiento contaminado con los 25 pesticidas OPs estudiados entre 0.4-2.0 mg/kg. Los números sobre los picos corresponden con los de la Tabla 7.2.*

### 7.3.- IDENTIFICACION DE PLAGUICIDAS OCs POR GC-MS.

Del mismo modo descrito para el caso de plaguicidas OPs se procedió al estudio de identificación del grupo de 13 plaguicidas OCs estudiados en el capítulo IV de esta memoria. Para ello, en primer lugar, se realizó una asignación tentativa de los fragmentos más característicos obtenidos para cada compuesto. En segundo lugar se procedió a la selección de los fragmentos más adecuados para la elaboración de un método en modo SIM. Por ultimo, se aplicó el método propuesto al análisis de muestras de pimiento contaminadas con la mezcla de OCs para comprobar su eficacia y calcular el límite práctico de detección de cada compuesto.



### 7.3.1.- Estudio y asignación de iones.

A diferencia de los compuestos organofosforados, cuya estructura básica, derivada del ácido fosfórico, es común a todos ellos, los plaguicidas OCs presentan estructuras radicalmente distintas entre sí. Este hecho hace imposible un estudio sistemático de los espectros de masas de tales compuestos, como el realizado para los OPs. Nos hemos limitado en este caso a proponer la asignación tentativa de los iones más importantes, que se recogen en la Tabla 7.3. Esta asignación se realizó a partir de los espectros obtenidos con disoluciones patrón de 50 ppm.

El pico del ión molecular está presente solo en algunos de los OCs estudiados con abundancias muy diferentes: Procimidona (19%), Tetradifon (15%), Clortalonil (70%), Vinclozolina (61%), Folpet (20%) y Cipermetrin (3%). Es común encontrar los picos  $[M+2]^+$  y  $[M+4]^+$ , como consecuencia del desdoblamiento isotópico característico de la presencia de átomos de cloro en la molécula.

Una pérdida que se repite en varios de estos compuestos es la correspondiente a uno o más átomos de cloro,  $[M-Cl]^+$  y sucesivas. La pérdida se puede producir sobre la molécula completa o sobre un fragmento, como en el caso de la Diclofluanida.

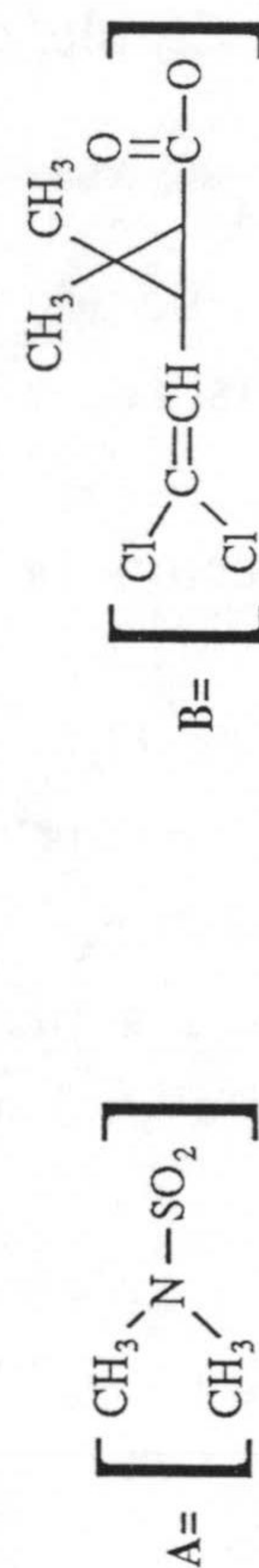
Otros iones que aparecen repetidamente son los correspondientes a  $m/z$  75, 76 y 77, característico de la presencia de un grupo bencénico.

### 7.3.2.- Selección de iones para el análisis en modo SIM.

Los iones seleccionados para el análisis fueron los que aparecen en la Tabla 7.4. En todos los casos coincidieron con picos de máxima abundancia, en orden a conseguir una mayor sensibilidad para los compuestos. Se seleccionó uno o dos iones para cada plaguicida. En el caso de compuestos que presentaban una escasa sensibilidad se seleccionaron dos iones para aumentar ésta.



Compuesto	m/z	Estructura	m/z	Estructura	m/z	Estructura	m/z	Estructura	m/z	Estructura
Lindano	254	[MH-Cl] <sup>+</sup>	219	[MH-2Cl] <sup>+</sup>	183	[M-3Cl] <sup>+</sup>	111	[M-6Cl] <sup>+</sup>		
Clortalonil	229	[M-Cl] <sup>+</sup>	194	[M-2Cl] <sup>+</sup>	168	[M-2Cl-CN] <sup>+</sup>	133	[M-3Cl-CN] <sup>+</sup>	266	[M+2] <sup>+</sup>
Vinclozolina	285	[M] <sup>+</sup>	187	[Ph <sub>2</sub> CINCO] <sup>+</sup>	159	[Ph <sub>2</sub> CIN] <sup>+</sup>	145	[Ph <sub>2</sub> Cl] <sup>+</sup>	198	
Diclofluanida	224	[M-A] <sup>+</sup>	189	[(M-A)-Cl] <sup>+</sup>	154	[(M-A)-2Cl] <sup>+</sup>	123	[(M-A-2Cl)-CF] <sup>+</sup>	92	[(M-A)-2Cl-CF-S+H] <sup>+</sup>
Captan	79	[C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> ] <sup>+</sup>	264	[M-Cl] <sup>+</sup>	299	[M] <sup>+</sup>				
Folpet	295	[M] <sup>+</sup>	260	[M-Cl] <sup>+</sup>	104	[PhCO] <sup>+</sup>	76	[Ph-2H] <sup>+</sup>		
Procimidona	283	[M] <sup>+</sup>	124	[PhCIN] <sup>+</sup>						
Dicofol	139	[PhClCO] <sup>+</sup>	111	[PhCl] <sup>+</sup>	75	[Ph-2H] <sup>+</sup>	251	[M-CCl <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>		
Tetradifon	229	[PhCl <sub>3</sub> SOH] <sup>+</sup>	111	[PhCl] <sup>+</sup>	175	[M-PhCl <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	159	[(M-PhCl <sub>3</sub> )-O] <sup>+</sup>	354	[M] <sup>+</sup>
Cipermetrin	415	[M] <sup>+</sup>	208	[M-B] <sup>+</sup>	181	[(M-B)-CNH] <sup>+</sup>	77	[Ph] <sup>+</sup>		





### 7.3.3.- Aplicación del método en muestras vegetales. Cálculo del límite de detección.

Se contaminaron extractos de pimiento a los que se les había aplicado el clean-up en minicolumnas de sílica descrito para plaguicidas OCs. Los extractos obtenidos en éter de petróleo:éter dietílico fueron llevados a sequedad con corriente de nitrógeno y recompuestos en ciclohexano antes del análisis por masas. Se realizó inicialmente una inyección en el rango completo de masas del extracto. La mayoría de los plaguicidas fueron identificados correctamente por la librería con porcentajes de concordancia de espectros >70%. Lindano y Dicofol dieron porcentajes algo menores (55% y 74%) mientras que Captan y Folpet no fueron identificados correctamente por su baja sensibilidad o por presencia de interferencias de matriz.

Se observó la aparición de los picos correspondientes a los productos de degradación de Folpet (8.63 min), Captan (8.33 min) y Dicofol (18.17 min) ya caracterizados en capítulos anteriores. La mayor resolución de la columna permitió la separación de los cuatro isómeros del Cipermetrin.

Los cromatogramas obtenidos en el rango de masas completo y en modo SIM para la mezcla de OCs se representa en la Fig. 7.4.



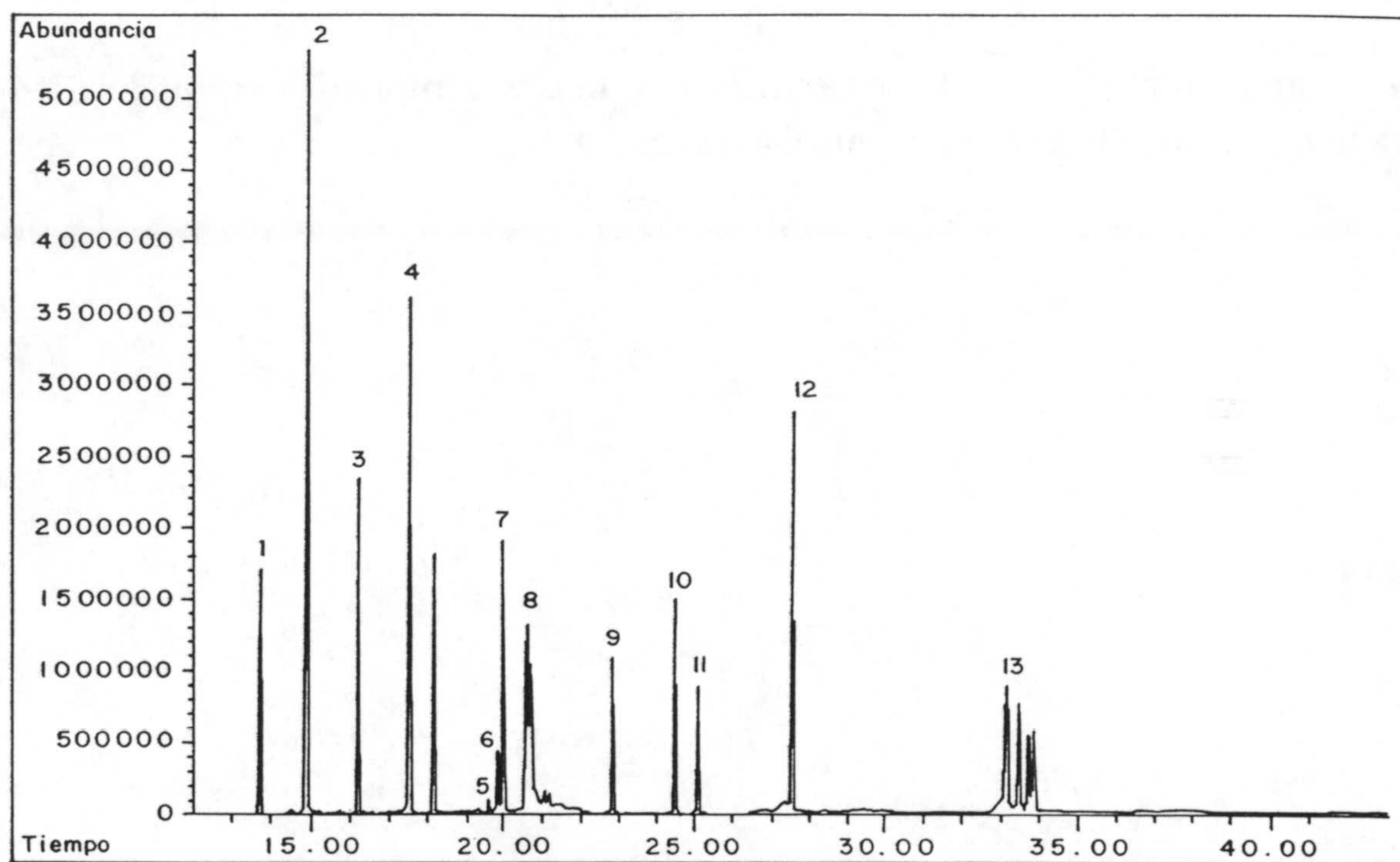
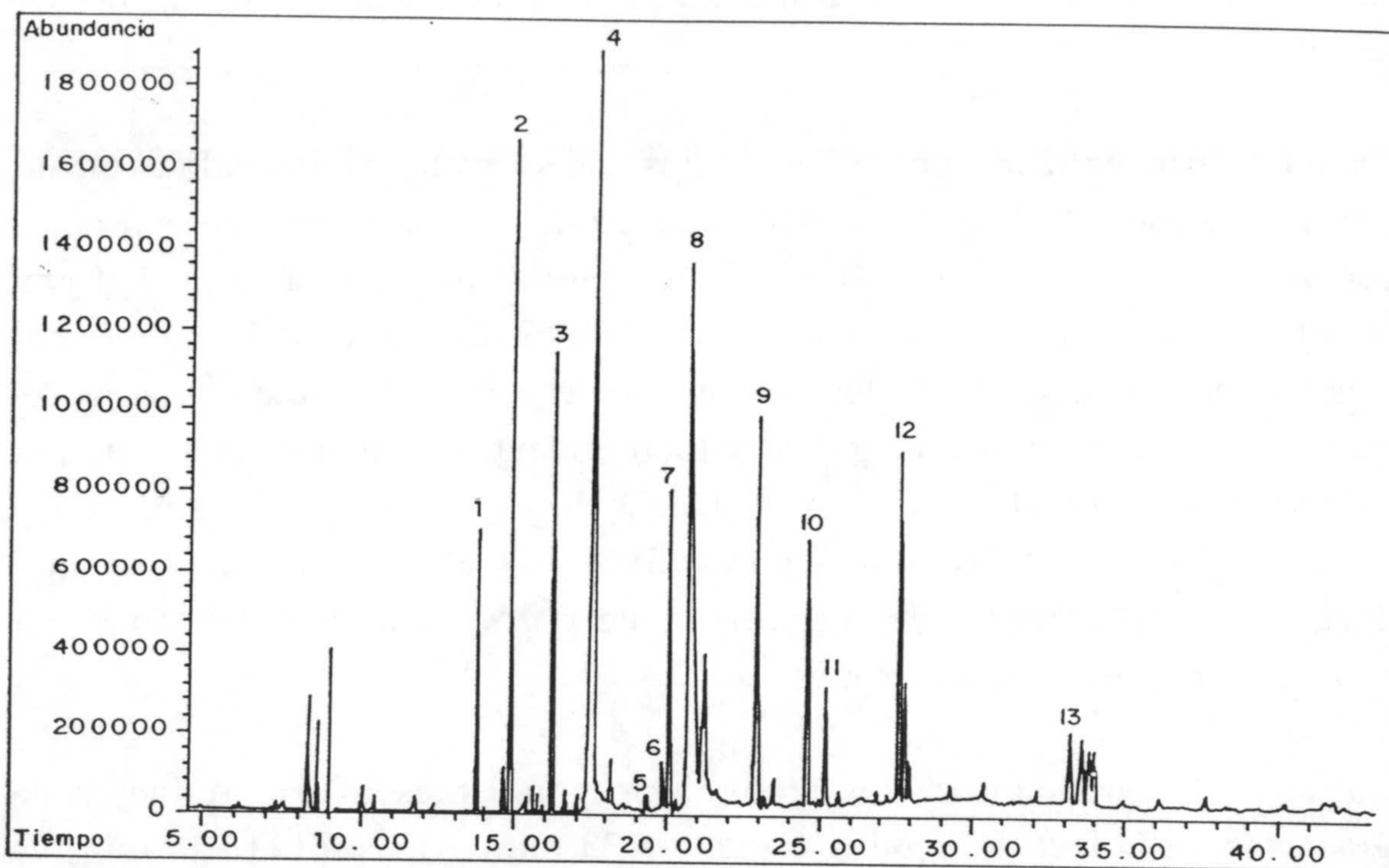


Figura 7.4.- Cromatogramas GC-MS obtenidos, en rango completo de masas y en modo SIM, con extractos de pimienta contaminados con la mezcla de pesticidas OCs.



#### **7.4.- APLICACION DE METODOS DE INMUNOENSAYO PARA LA IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE PROCIMIDONA EN MUESTRAS VEGETALES.**

En el presente capítulo hemos desarrollado la aplicación de un ELISA competitivo comercial para el análisis de Procimidona en muestras vegetales.

##### **7.4.1.- Métodos experimentales.**

###### **7.4.1.1.- Método de extracción.**

Se aplicó sobre muestras frescas de pimiento recogidas en invernaderos de la provincia de Almería que no habían sido tratadas con Procimidona. Estas muestras fueron contaminadas con este pesticida a nivel de 1-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y se extrajeron de la forma siguiente:

Se pesan, de forma exacta, 50 g de muestra debidamente triturada y homogeneizada, a los que se añaden 40 g de sulfato sódico anhidro y 100 mL de acetato de etilo. Se agita la mezcla a alta velocidad durante 5 min. El líquido sobrenadante se filtra por succión a través de un papel de filtro sobre el que se ha colocado una capa de sulfato sódico anhidro de 20 g. La extracción y filtración se repiten una vez más. Se lava el filtro con 50 mL de acetato de etilo y los extractos combinados se llevan a sequedad en rotavapor a 40-60°C. El residuo seco se recoge en 10 mL de éter de petróleo. Con el fin de obtener extractos más limpios se incluyó un paso de clean-up, ya descrito, que consistió en pasar 2 mL de este extracto por una columna de EFS de sílica gel (500 mg), previamente acondicionada, a un flujo de elución de 1-2 mL/min. Los pesticidas retenidos en la columna eran eluidos con 2 mL de una mezcla de éter de petróleo en éter etílico (1:1). Obtenemos, por fin 2 mL de extracto en éter dietílico:éter de petróleo que es llevado a sequedad mediante corriente de nitrógeno y redissuelto con 2 mL de agua con ayuda de sonicación.

###### **7.4.1.2.- Análisis por Inmunoensayo.**

Los extractos de muestras fortificadas obtenidos con el método de extracción descrito, así como disoluciones patrón de inmunoensayo, eran analizadas de acuerdo con el siguiente procedimiento:



Se añaden, en un tubo tamizado con anticuerpos de Procimidona, 160  $\mu\text{L}$  del extracto o disoluciones patrón a analizar y 160  $\mu\text{L}$  de la enzima conjugada y se dejan incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se lavan los tubos cinco veces con agua destilada para eliminar los restos de muestra y de enzima conjugada que no hayan reaccionado. Seguidamente se lleva a cabo la reacción mediante la adición de 160  $\mu\text{L}$  de sustrato (peróxido de hidrógeno) y 160  $\mu\text{L}$  de cromógeno (tetrametilbencidina). Los tubos son incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de añadir una gota de ácido sulfúrico 2,5 N para parar la reacción. Finalmente se añaden 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La concentración de Procimidona en la muestra se determina leyendo la absorbancia a 450 nm. En cada tanda de análisis, tanto de patrones como de muestras, se incluye un tubo de control (cero standard) para calcular  $\%B/B_0$  (absorbancia a 450 nm de la muestra o patrón / absorbancia a 450 nm del control  $\times 100$ ). Una mayor concentración de Procimidona en las muestras producirá una mayor disminución del color (amarillo más pálido).

#### 7.4.1.3.- Criterio de identificación y cuantificación.

La cuantificación de la Procimidona en las muestras se realizaba mediante la construcción de una recta de regresión lineal entre el logaritmo de la concentración de Procimidona y  $\%B/B_0$ , calculada después del análisis de soluciones patrón de Procimidona de 5, 10, 30 y 80  $\mu\text{g/L}$ .

Dado que un aumento en la concentración de Procimidona daba lugar a una menor densidad óptica y por tanto a un menor valor de  $\%B/B_0$ , se adoptó como criterio de identificación positiva un desplazamiento con respecto al valor del blanco del 73%, es decir,  $\%B/B_0 \leq 73\%$ .

#### 7.4.1.4.- Validación del método.

Para la validación del método se estudiaron los siguientes parámetros:

*Reproducibilidad del ensayo.* Se probó la reproducibilidad del ensayo propuesto realizando tres repeticiones del mismo en el mismo día y en días diferentes. Los ensayos en días distintos tuvieron lugar durante un periodo de tres meses y en ellos se utilizaron kits de inmunoensayo de lotes diferentes.



*Estudios del rango lineal.* Se estudio el rango de respuesta del test de inmunoensayo. Para ello se prepararon soluciones patrón de Procimidona añadiendo alícuotas de 30, 50, 100, 200, 300, 800, 1000 y 2000  $\mu\text{L}$  de la solución patrón de trabajo de 0.2 mg/L a viales que contenían 2 mL de extracto de muestras de pimiento en éter dietílico:éter de petróleo (1:1). Cada una de estas disoluciones era llevada a sequedad con corriente de nitrógeno y recompuesta con 2 mL de agua. Se obtenían así disoluciones patrón en extracto de pimiento en un rango de concentración entre 3-200  $\mu\text{g/L}$  que eran analizadas mediante esta técnica. Se representaron los valores de log de concentración de Procimidona frente al  $\%B/B_0$  obtenido. Cada punto se calculó como media de cinco determinaciones.

*Pruebas de recuperación.* Muestras frescas de pimiento que no había sido tratado con Procimidona fueron fortificadas con este pesticida con concentraciones a tres niveles 2, 6, y 10  $\mu\text{g/kg}$  aplicándose seguidamente el método descrito. Se hicieron tres determinaciones a cada nivel y se probaron tres variedades de pimiento: verde, amarillo y rojo.

*Estudios de reactividad cruzada.* Se estudió la posibilidad de reacciones cruzadas del anticuerpo específico con otros fungicidas derivados de la 3,5-dicloroanilina (como son Vinclozolina, Clozolinato e Iprodiona) u otros pesticidas de similar estructura como Benomilo, Carbendacima y Tiabendazol. Para ello se prepararon soluciones de Procimidona de 30  $\mu\text{g/L}$  que contenían cada una 3000  $\mu\text{g/L}$  de cada uno de los posibles interferentes y se analizaron siguiendo el método descrito.

*Efecto matriz.* Se llevaron a cabo algunas pruebas para comprobar la necesidad de realizar el clean-up con sílica previo al ensayo ELISA de Procimidona en muestras de pimiento. Para ello se analizaron extractos sin contaminar de pimiento verde, rojo y amarillo con y sin la realización de un clean-up previo, y se calcularon los porcentajes de inhibición referidos a los valores ELISA para agua destilada.



## 7.4.2.- Resultados y discusión.

### 7.4.2.1.- Validación del método.

*Reproducibilidad.* Los resultados del estudio de reproducibilidad se muestran en la Tabla 7.5. Se puede apreciar que fueron aceptables en todos los casos, oscilando entre el 3.5 y 18.0 % cuando los ensayos se realizaban en el mismo día y entre 8.0 y 16.0% cuando se realizaban en días distintos.

TABLA 7.5.

*Recuperaciones y reproducibilidad de los test de inmunoensayo de Procimidona para muestras de pimiento contaminadas a diferentes niveles de concentración entre 2-16 µg/kg.*

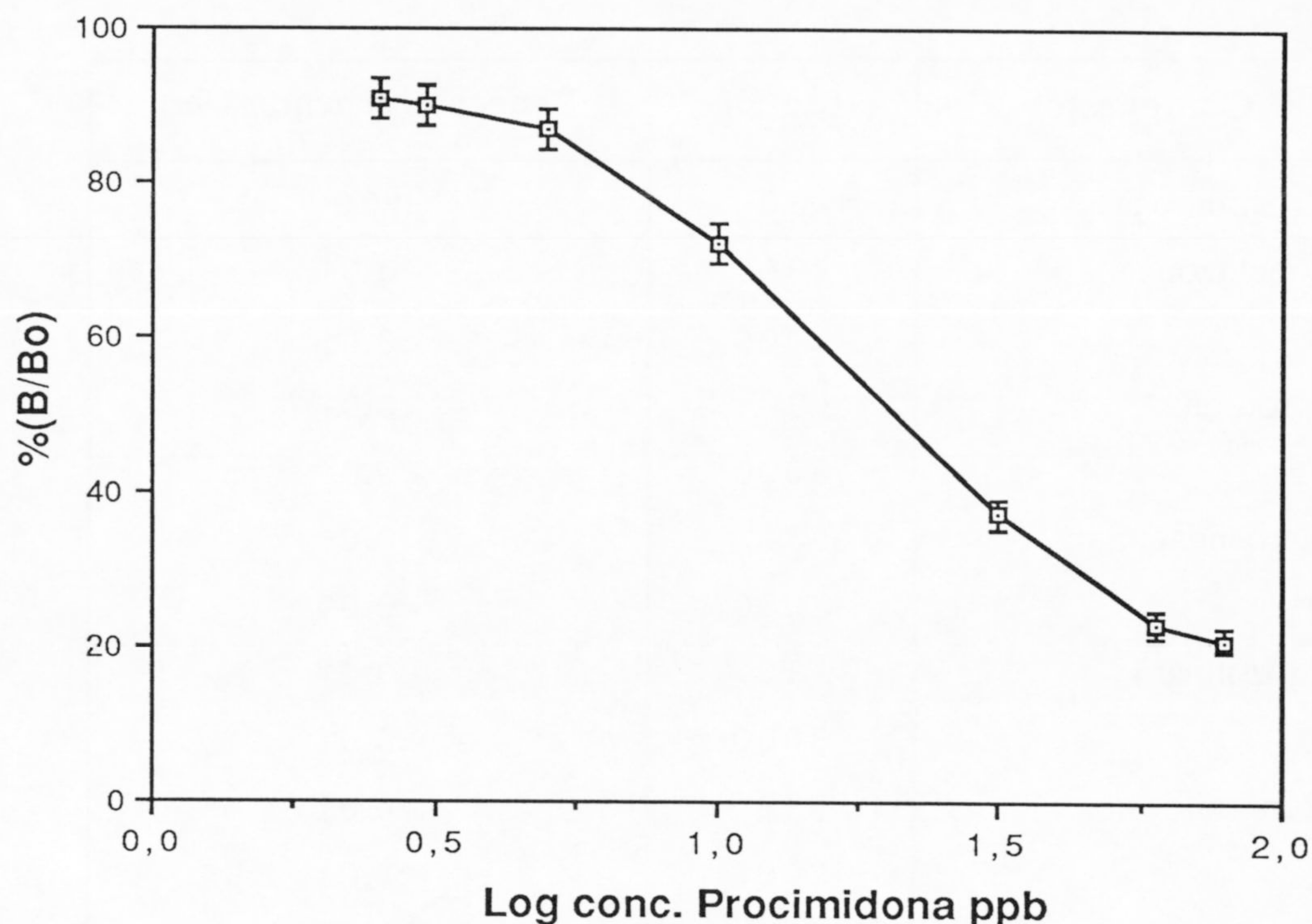
Tipo de pimiento	Contaminación (µg/kg)	Recuperación (%)	CV (%) a (intra-ensayo)	CV (%) b (inter-ensayo)
Amarillo	2	70.2	8.5	16,0
	6	99.0	7.1	15,0
	10	73.4	12.0	11,0
Verde	2	75.8	3.5	13,0
	6	120.9	18.0	15,0
	10	90.2	8.5	9,3
Rojo	2	119.4	12.0	14,0
	6	80.5	9.4	8,0
	10	108.7	15.0	16,0

*Estudios de linealidad.* Tras analizar los extractos preparados como se indicó en el capítulo 7.4.1.4, se observó una buena relación lineal ( $R=0.999$ ) para concentraciones entre 5-80 µg/L de Procimidona, lo que equivale a 1-16 µg/kg en muestra.

La Fig. 7.5 muestra la curva de respuesta (para valores medios de 5 análisis) de cuatro soluciones de patrones seleccionadas para calibrar los test. Para muestras con concentraciones mayores de 80 µg/L es necesario diluir el extracto.



El desplazamiento a  $10 \mu\text{g/L}$  (que representa  $2 \mu\text{g/kg}$  en pimiento), es significativo,  $73 \%B/B_0$ , valor que fue tomado como criterio de identificación positiva. La sensibilidad del ensayo se estimó en  $3 \mu\text{g/L}$ ,  $0.6 \mu\text{g/kg}$  en muestra, considerando un desplazamiento de  $90 \%B/B_0$ . Esto significa que el límite de detección es mucho más bajo que el obtenido con el método cromatográfico tradicional lo cual satisface las necesidades de sensibilidad.



*Figura 7.5.- Curva de respuesta de la Procimidona. Cada punto representa la media de cinco determinaciones. Las barras verticales indican  $\pm 2S.D.$  de la media.*

*Pruebas de recuperación.* En la Tabla 7.5 se recogen los resultados de las recuperaciones obtenidas a tres niveles:  $2, 6$  y  $10 \mu\text{g/kg}$ , sobre muestras de pimiento amarillo, verde y rojo.. Los resultados de los ensayos dieron valores entre  $1.4-2.3 \mu\text{g/kg}$ ,  $4.8-7.3 \mu\text{g/kg}$  y  $7.3-10.8 \mu\text{g/kg}$ , para cada uno de los niveles, lo que suponía valores de recuperación entre el  $70-120\%$ .

*Estudios de reactividad cruzada.* Se estudió la posibilidad de reacciones cruzadas del anticuerpo específico con otros fungicidas como son Vinclozolina, Clozolinato e Iprodiona u otros pesticidas de similar estructura como Benomilo, Carbendacima y Tiabendazol. Los resultados demostraron que no existía reactividad cruzada para estos pesticidas a este nivel. Aunque solo se ha



estudiado un limitado número de pesticidas se ha demostrado que el anticuerpo tiene una alta especificidad hacia la Procimidona. Los resultados aparecen en la Tabla 7.6.

TABLA 7.6

*Estudio de posible reactividad cruzada del anticuerpo de Procimidona hacia una selección de fungicidas.*

Compuesto	( $\mu\text{g/L}$ )	Reacción cruzada (%)
Procimidona	30	100
Vinclozolina	30	<0.01
	3000	<0.01
Iprodiona	30	<0.01
	3000	<0.01
Carbendazima	30	<0.01
	3000	<0.01
Clozolinato	30	<0.01
	3000	<0.01
Benomilo	30	<0.01
	3000	<0.01
Tiabendazol	30	<0.01
	3000	<0.01

*Efecto matriz.* La Tabla 7.7 muestra los niveles de inhibición de anticuerpos de Procimidona debidos a la matriz para diferentes extractos de blancos de pimiento obtenidos mediante el método de extracción propuesto, con y sin clean-up previo. Se observa que cuando el clean-up era omitido se obtenían valores de inhibición mayores del 25% mientras que con clean-up eran inferiores al 15%. Además la variabilidad en el porcentaje de inhibición obtenida con el mismo tipo de matriz ( $CV \geq 18\%$ ) y con diferentes matrices ( $CV = 21\%$ ) era mayor en el caso de omitir la limpieza. Esto pone de manifiesto la necesidad de realizar un clean-up eficaz previo al ensayo ELISA para muestras de pimiento.



TABLA 7.7.

Porcentaje de inhibición y coeficiente de variación (CV%) de anticuerpos de Procimidona para diferentes blancos de muestras de pimiento.

Tipo de pimiento	% Inhibición			
	Sin clean-up	CV(%) <sup>a</sup>	Con clean-up	CV(%) <sup>b</sup>
Amarillo	28	20	12	6
Verde	25	18	15	8
Rojo	31	21	11	9

#### 7.4.2.2.- Confirmación cromatográfica.

Dos partidas de pimientos, A y B, fueron contaminadas con niveles de Procimidona de 2 y 8 mg/kg y analizadas independientemente con el método ELISA y con el método cromatográfico. La Fig.7.6 muestra un ejemplo de cromatogramas obtenidos mediante el análisis GC-ECD de dos muestras de pimiento contaminadas con Procimidona a los dos niveles citados.

TABLA 7.8.

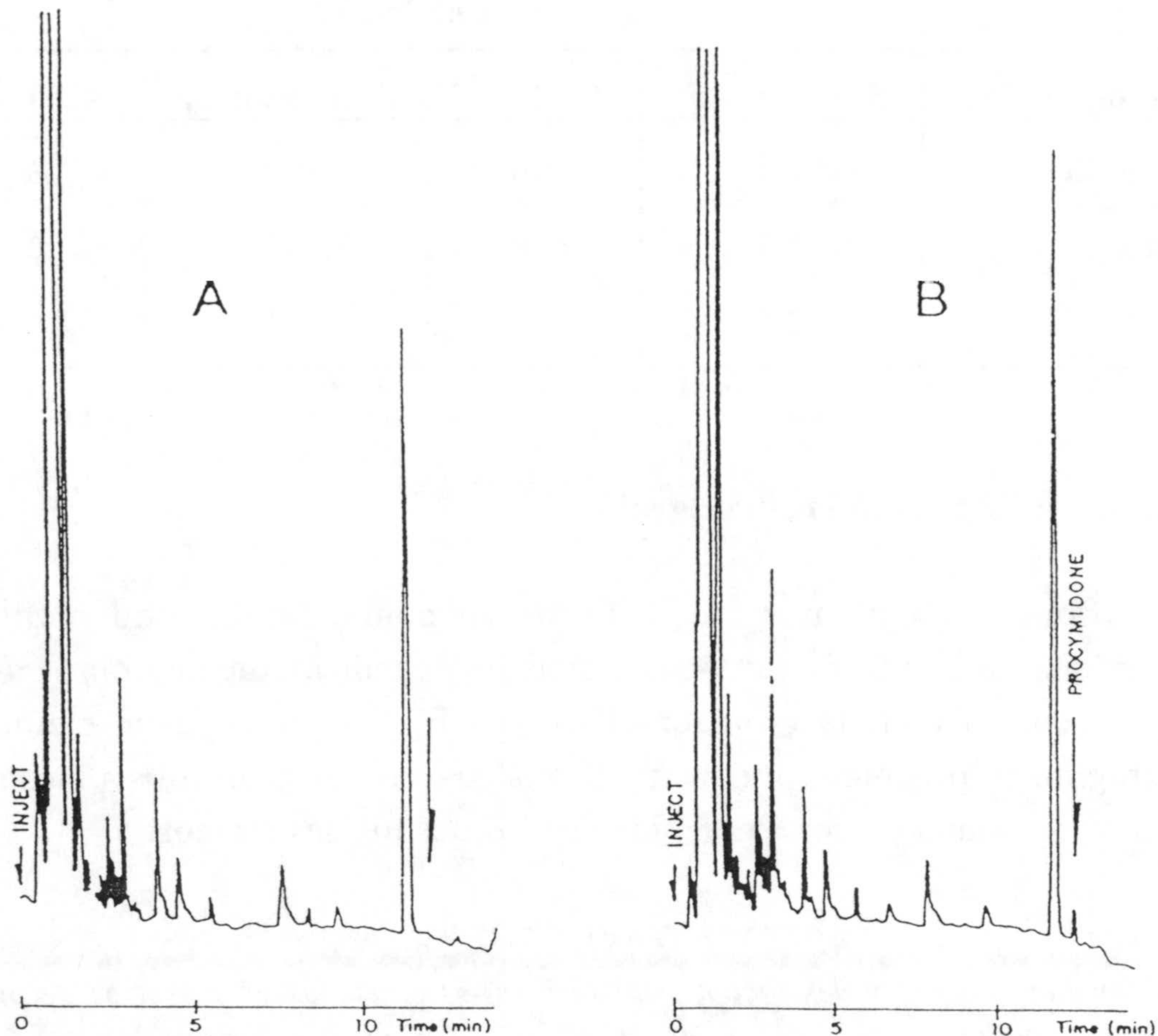
Niveles medios (mg/kg) y desviación estándar (n=5) obtenidos en muestras de pimiento contaminadas con Procimidona y analizadas mediante ELISA y GC-ECD.

Técnica	Lote A		Lote B	
	Nivel de contaminación (µg/kg)		Nivel de contaminación (µg/kg)	
	2	8	2	8
ELISA	1.6±0.2	10.1±2.0	1.5±0.3	6.7±1.3
GC-ECD	no detectado	8.8±0.4	no detectado	9.2±0.5

Los resultados cuantitativos obtenidos por ELISA a niveles de 8 mg/kg (ver Tabla 7.8) coinciden bastante con los obtenidos por GC-ECD aunque el coeficiente de variación es menor cuando se aplica el método cromatográfico.



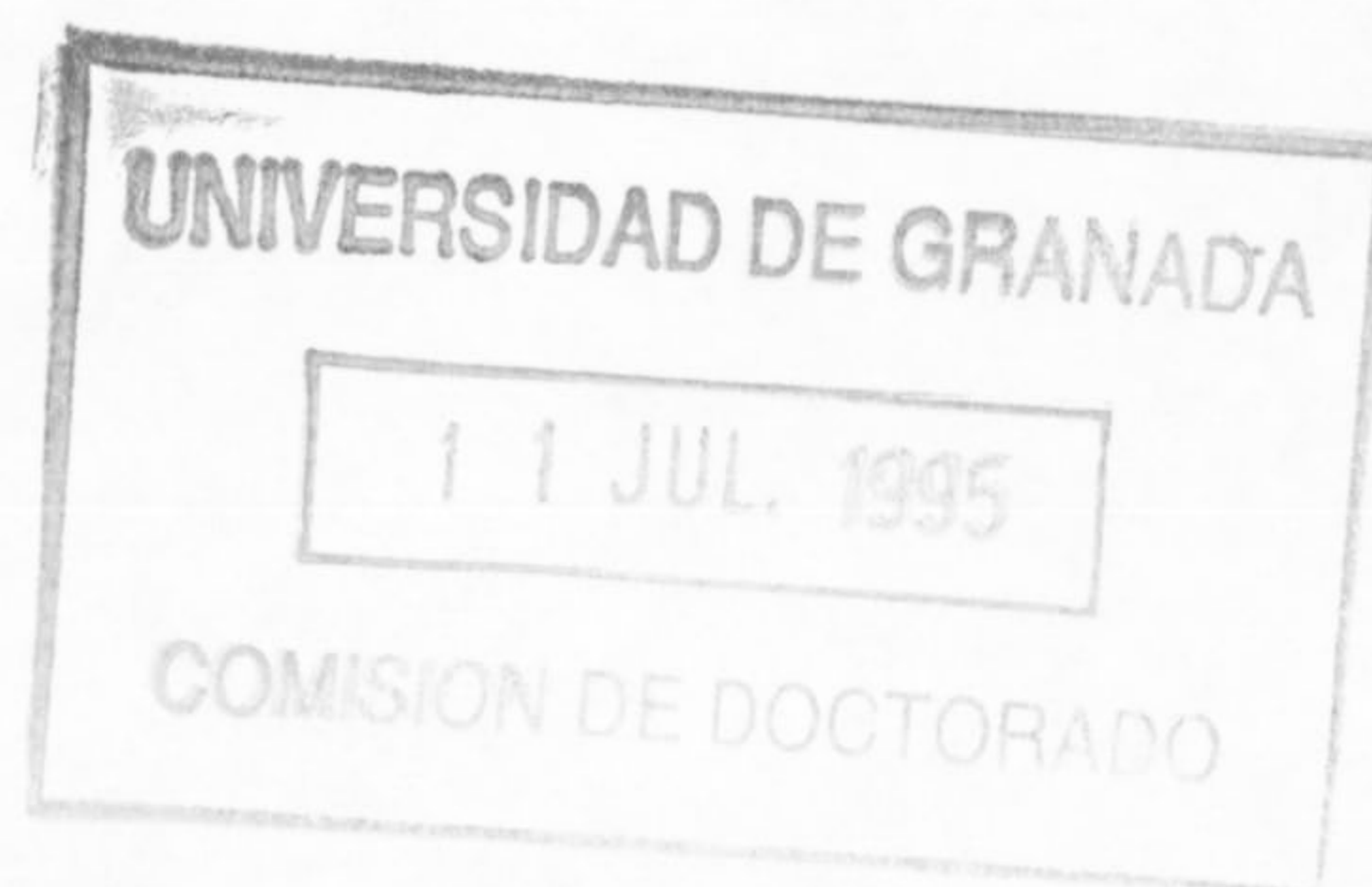
Como se observa en la Fig. 7.6 la principal ventaja del método ELISA es la buena detección de residuos de Procimidona a niveles de 2 mg/kg que no pueden ser detectados en cromatografía.



*Figura 7.6.- Cromatogramas GC-ECD de muestras de pimiento contaminadas a concentraciones de Procimidona de (A) 2 mg/kg, (B) 8 mg/kg.*

Por otro lado el método ELISA hace posible el análisis completo de una muestra en 45 minutos con la ventaja de que varias muestras pueden analizarse simultáneamente. Esto representa un aumento significativo en el número de muestras que pueden ser analizadas en comparación con el método cromatográfico.





**CAPITULO VIII**  
**CONCLUSIONES.**







## CAPITULO VIII

### CONCLUSIONES.

- 1.- Se desarrolló un método de extracción multirresiduos con acetato de etilo capaz de recuperar eficazmente un grupo de 25 pesticidas OPs, con muy diferentes propiedades en cuanto a polaridad, en matrices vegetales.
- 2.- Se desarrolló un método de análisis cromatográfico para los 25 pesticidas OPs que fue optimizado mediante un método de optimización secuencial, lo que supuso la obtención de métodos de análisis cortos (16 min) que nos permiten analizar hasta 68 muestras diarias. El límite de cuantificación fue de entre 0.01-0.03 mg/kg para estos pesticidas, lo que estaba de acuerdo con los LMRs permitidos en todos los países comunitarios.
- 3.- El método de extracción desarrollado para pesticidas OPs se aplicó al análisis de 13 pesticidas OCs y piretroides gracias al desarrollo de un sistema de clean-up del extracto mediante EFS con cartuchos desechables de sílica, que nos permitía obtener extractos limpios que se podían analizar mediante GC-ECD. De esta forma un único método podía ser aplicado a la extracción de pesticidas OPs y OCs.
- 4.- El método cromatográfico de análisis de los 13 OCs fue optimizado, mediante un método simultaneo de optimización, permitiéndonos obtener tiempos de análisis cortos (de 22 min), sobre todo teniendo en cuenta que se incluye el análisis de compuestos piretroides (Cipermetrin), fuertemente retenidos en el sistema cromatográfico.
- 5.- Se desarrolló un método multirresiduos, mediante HPLC-DAD, para determinación de N-Metilcarbamatos e Imidacloprid, compuesto nuevo de gran importancia, por su uso, en la provincia de Almería. El uso del detector de diodos nos permitió contar con un criterio de identificación adicional al tiempo de retención de los compuestos, que consistió en la comparación de los espectros de los picos en las muestras con los espectros de los patrones almacenados en una librería, previamente creada por nosotros. Los límites de cuantificación obtenidos con el método estuvieron de acuerdo con los LMRs permitidos.



6.- Dada la novedad del Imidacloprid, se estudió su comportamiento con diferentes sistemas de extracción así como su caracterización por HPLC-MS.

7.- Se desarrolló un método multirresiduos, mediante HPLC-DAD, para la determinación de cinco Benzoilfenilureas mediante extracción con AcN:Agua y posterior preconcentración y clean-up con minicolumnas de EFS de sílica enlazada con C-18. Se obtuvieron cromatogramas limpios con buenas recuperaciones, >80%, para todos ellos. El límite de cuantificación del método estuvo de acuerdo con los LMRs fijados para estos compuestos en la legislación española.

8.- Todos los métodos desarrollados se validaron, con buenos resultados, mediante el cálculo de los parámetros: precisión (cálculo de repetitividad y reproducibilidad), linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud (estudios de recuperación) y especificidad del método (estudio de efectos de matriz).

9.- Se desarrollaron y aplicaron sistemas de control de calidad de los métodos de cara a su aplicación en análisis de rutina. Estos sistemas consistieron en controles internos, mediante el uso de muestras de control y cartas de control de patrones y, en el caso de los pesticidas OPs, en controles externos mediante la realización de un ejercicio de intercalibración.

10.- Se aplicaron los métodos de análisis y controles de calidad, propuestos para OPs, OCs, Imidacloprid y N-Metilcarbamatos, al análisis de muestras reales durante la campaña de producción 1993/94 con buenos resultados.

11.- Se estudió, para el caso de pesticidas OPs y OCs, la posible aplicación de la cromatografía de gases con detector de masas GC-MS como criterio de identificación en análisis de rutina en muestras vegetales. Para ello se realizó un estudio previo de los espectros de masas de estos compuestos, proponiéndose la asignación tentativa de estructuras para los iones más importantes.

12.- Se desarrolló un método de análisis de pesticidas OPs y OCs mediante GC-MS en modo SIM, con programación de iones, sobre muestras de pimiento. Se demostró que los pesticidas estudiados eran identificados correctamente en base a los dos criterios seleccionados, tiempo de retención y presencia de uno o dos



iones característicos. Los límites de detección obtenidos sobre extractos de pimiento contaminados fueron bajos en la mayoría de los casos, del orden de 10-20 ppb. Sólo Metamidofos (100 ppb), Captan y Folpet (200 ppb), presentaban límites más altos.

13.-Se estudió la aplicabilidad de un kit comercial de ELISA para la identificación y cuantificación de residuos de Procimidona a muy bajos niveles ( $< 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) en muestras de pimiento. Las muestras requerían una extracción y clean-up previos al ensayo ELISA. Los resultados obtenidos en cuanto a recuperación y precisión fueron aceptables, no detectándose reactividad cruzada con otros compuestos como Vinclozolina, Iprodiona, Clozolinato, Carbendazima, Benomilo y Tiabendazol.

14.- El método ELISA resultó ser menos preciso que los métodos cromatográficos pero tiene las ventajas de ser un método sensible, rápido y de bajo coste que de forma complementaria, puede aplicarse en aquellos casos en que las necesidades de sensibilidad lo requieran.

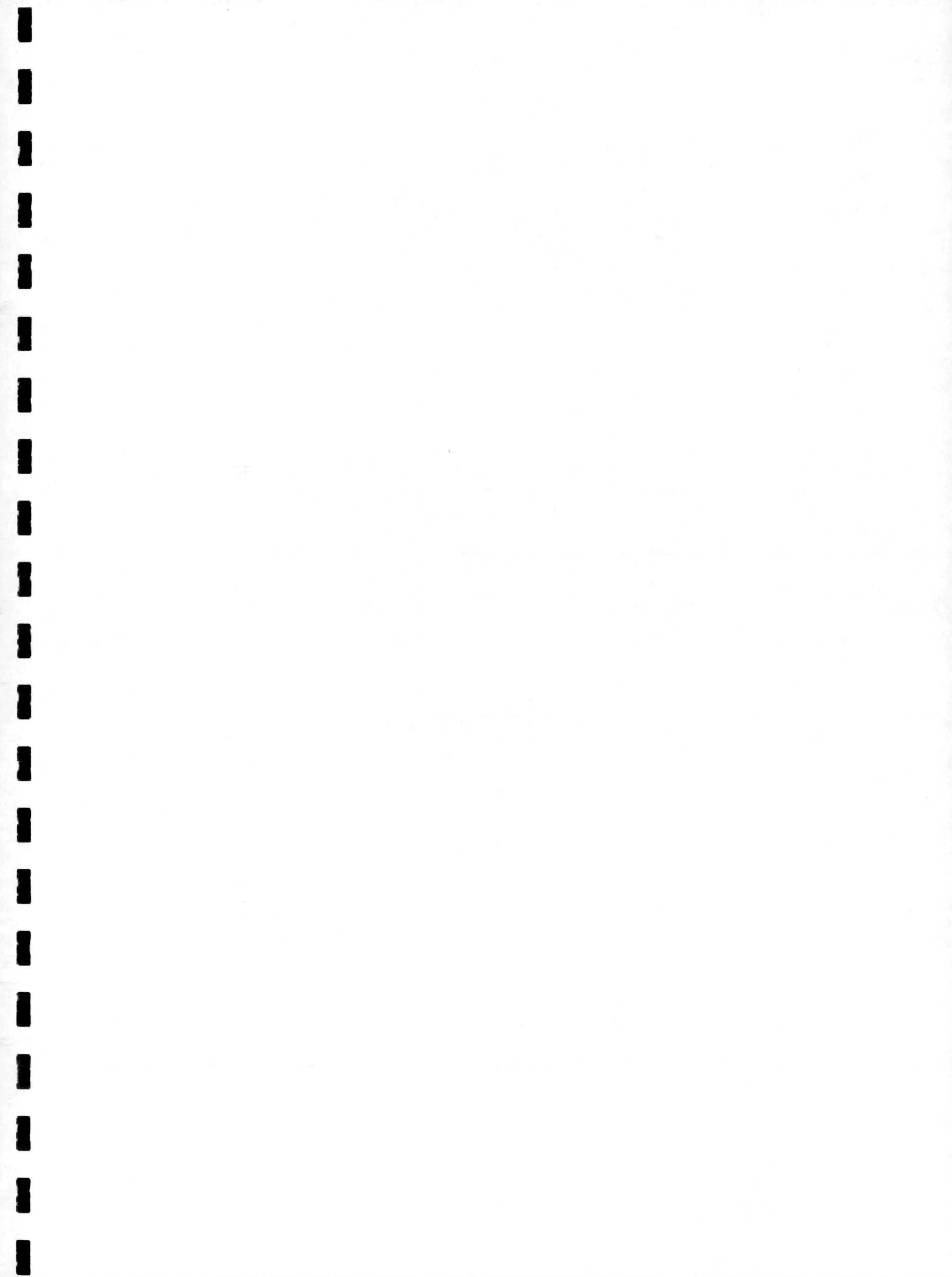






**BIBLOGRAFIA**







## BIBLOGRAFIA

- (1) R.R. Wats (Editor), *Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticides; EPA-600/8-80-038*, Environmental Protection Agency, Environmental Toxicology Division, Health Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, NC, 1980.
- (2) J. Villén, F.J. Señoraiz, M. Herraiz, G. Reglero y J. Tavera, *J. Chromatogr. Sci.*, 30 (1992) 261.
- (3) P.J. Schoenmakers, *Optimization of Chromatographic Selectivity - A Guide to Method Development.*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- (4) V. López-Avila, J. Bendicto, E. Baldin y W.F. Beckert, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15 (1992) 319.
- (5) G.E.P. Box y J.S. Hunter, *Ann. Math. Stat.*, 28 (1957) 195.
- (6) D.P. Goodspeed y L.I. Chestnut, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74 (1991) 388.
- (7) S.M. Lee, M.L. Paphatakis, H.C. Feng, G.F. Hunter y J.E. Carr, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 376.
- (8) S.W. Tillkes, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 322 (1985) 443.
- (9) C. Bicchi, A. D'Amato, I. Tonutti y M. Taccheo Barbina, *Chromatographia*, 20 (1985) 219.
- (10) M.V. Russo, G. Goretti y A. Liberti, *Chromatographia*, 35 (1993) 290.
- (11) R.W. Martindale, *Analyst*, 113 (1988) 1229.
- (12) L. Kadenczki, A. Zoltan y I. Gardi, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 75 (1992) 53.
- (13) H.J. Scattenberg y J.P. Hsu, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 75 (1992) 925.
- (14) G. René van der Hoff, M. Gort, R.A. Baumann, P. van Zoonen y A.T. Brinkman, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 14 (1991) 465.
- (15) A. Elbert, H. Overbeck, K. Iwaya, S. Tsuboi, Bayer A.G., D-5090 Leverkusen, 1 Fed. Rep. Ger. Brighton Crop Prot Conf. Pest. Dis. (1990), 21.
- (16) W. Leicht, *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 4, 3 (1993) 17.
- (17) C. Tomlin, "The Pesticide Manual: A world compendium" 10th Edition. The British Crop Protection Council, Corydon U.K. (1994).



- (18) F.J. Placke y E. Weber, *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 46, 64 (1993) 109.
- (19) Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry, *Analyst*, 114 (1989) 1497.
- (20) W. Horwitz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71 (1988) 160.
- (21) A.R. Fernández-Alba, J.L. Martínez y P. Parrilla, *Proceedings of 12th International Symposium on Microchemical Techniques, ISM'92*, Cajasur, Cordoba, 1992, p. 220.
- (22) S.M. Deming, *J. Chromatogr.*, 550 (1991) 15.
- (23) A. Andersson y B. Ohilin, *Var Föda*, 38 (1986) 77.
- (24) *Determination of Nitrogen- and Phosphorus-Containing Pesticides in Water by GC with a Nitrogen Phosphorus Detector. Method 507, Rev. 2.0*, US Environmental Protection Agency, National Technical Information Service, Springfield, VA, 1989.
- (25) J.P.G. Wilkins, A.R.C. Hill y D.F. Lee, *Analyst*, 110 (1985) 1045.
- (26) A.R.C. Hill, J.P.G. Wilkins, N.R.I. Findley y K.E.M. Lontay, *Analyst*, 109 (1984) 483.
- (27) G. Durand y D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 243 (1991) 259.
- (28) D. Barceló, M. Solé, G. Durand y J. Albaigés, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 676.
- (29) D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 263 (1992) 1.
- (30) J.P.G. Wilkins, *Pestic. Sci.*, 29 (1990) 163.
- (31) H.J. Stan y J. Lipinski, *HP Pesticide Library*, Publication No. G1038-90001 Hewlett-Packard, Avondale, PA, 1989.
- (32) A. Andersson y H. Pålsheden, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 365.
- (33) C. Barberá, *Pesticidas agrícolas*, 4ª Edición, Omega, Barcelona (1990).
- (34) C. De Liñan, *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*, 10ª Edición, Edic. Agrotécnicas S.L., (1994).
- (35) H.M. Lott y S.A. Barker, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 76 (1993) 67.
- (36) S.T. Hadfield, J.K. Sadler, E. Bolygo y I.R. Hill, *Pestic. Sci.*, 34 (1992) 207.
- (37) P.A. Mills, L.H. Onley y R.A. Gaither, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 48 (1963) 186.
- (38) R.R. Watts (Editor), *Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticides*; EPA-600/8-80-038, Environmental



- Protection Agency, Environmental Toxicology Division, Health Research Laboratory, Research Triangle Park, NC, 1980.
- (39) D.M. Gilvydis y S.M. Walters, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74 (1991) 830.
- (40) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, AOAC, Arlington, VA, 1984, Sect. 29.
- (41) M.A. Luke, J.E. Froberg, G.M. Doose y H.T. Masumoto, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64 (1981) 1187.
- (42) A. Ambrus y H.P. Thier, *Pure Appl. Chem.*, 58,7 (1986) 1035.
- (43) J.B. Leary, *Anal. Meth. Pest. Plant. Growth Regul.*, 7 (1973) 339.
- (44) A. Valverde García, E. Gonzalez y A. Agüera, *J. Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 2188.
- (45) A. Agüera, M. Contreras y A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr.*, 665 (1993) 293.
- (46) F. Hernández, J.M. Grases, J. Beltran y J.V. Sancho, *Chromatographia*, 29, 9/10 (1990) 459.
- (47) D. Volmer, A. Peiss y K. Levson, *J. Chromatogr.*, 647 (1993) 235.
- (48) J. Abián, F. Sánchez-Baeza, E. Gelpi y D. Barceló, *J. Am. Chem. Soc.*, 5 (1994) 186.
- (49) S. Lacorte, C. Molina y D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 281 (1993) 71-84.
- (50) M.A. Luke, J.E. Froberg y H.T. Masumoto, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58 (1975) 1020.
- (51) W.P. Cochran, M. Lanouette y S. Trudeau, *J. Chromatogr.*, 243 (1982) 307. (Carbamatos)
- (52) A. de Kok y M. Hiemstra, *J. AOAC Int.*, 75 (1992) 1063.
- (53) R.L. Graves, EPA Method 531.1, Revision 3.0 (1989) (Carbamatos)
- (54) J.W. Mullins, ASC Symp. Ser. 524 (1993) 183.
- (55) D. Barceló, *Chromatographia*, 25 (1988) 928.
- (56) B.D. McGarvey, *J. Chromatogr.*, 642 (1993) 89.
- (57) N. de Bertrand, G. Durand y D. Barceló, *Environ. Sci. Health*, A 26(4) (1991) 575.
- (58) U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, 24 (1987) 190.
- (59) H.A. Moye, S.J. Scherer y P.A. St.John, *Anal. Lett.*, 10 (1977) 1049.
- (60) R.T. Krause, *J. Chromatogr.*, 185 (1979) 615.



- (61) K.M. Hill, R.H. Hollowell y L.D. Dal Cortivo, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2465.
- (62) E. Ballesteros, M. Gallego y M. Valcarcel, *J. Chromatogr.*, 633 (1993) 169.
- (63) A. de Kok, M. Hiemstra y C.P. Vreeker, *Chromatographia*, 24 (1987) 469.
- (64) A. de Kok, M. Hiemstra y C.P. Vreeker, *Chromatographia*, 507 (1990) 459.
- (65) I. Mukherjee y M. Gopal, *J. AOAC Int.*, 76 (1993) 283.
- (66) J.E. Quintanilla-López, R. Lebrón-Aguilar y L.M. Polo-Díez, *J. Chromatogr.*, 591 (1992) 303.
- (67) A. Robbat, Jr, C. Liu y T.Y. Liu, *J. Chromatogr.*, 625 (1992) 277.
- (68) Y. Odanaka, O. Matano y S. Goto, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 368.
- (69) R.C. Hsu, I. Biggs y N.K. Saini, *J. Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 1658.
- (70) H. Steinwandter, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 343 (1992) 887.
- (71) A. Andersson y B. Ohlin, *Var Föda*, 38 (1986) 79.
- (72) W. H. Newsome y P. Collins, *J. Chromatogr.*, 472 (1989) 416.
- (73) C. Schlett, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 344.
- (74) A. Di Muccio, A. Ausili, L. Vergori, I. Camoni, R. Dommarco, L. Gambetti, A. Santilio, y F. Vergori, *Analyst*, 115 (1990) 1167.
- (75) M. Miyahara, M. Murayama, T. Suzuki y Y. Saito, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 221.
- (76) P. Armishaw y R.G. Millar, *J. AOAC Int.*, 76 (1993) 1317.
- (77) T. Cairns, E.G. Siegmind y G.M. Doose, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 30 (1983) 117.
- (78) W. Hortwitz, L.R. Kamps y K.W. Boyer, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63 (1980) 6.
- (79) W.A. Hopkins y D.R. Lauren, *J. Chromatogr.*, 516 (1990) 442.
- (80) R.S. Bakowski, M. Sher Ali, D. White y E.T. Phillippo, *J. AOAC Int.*, 77 (1994) 1568.
- (81) *Diario Oficial de la CEE*, Serie L, Directivas Comunitarias 79/700. Bruselas 1979.
- (82) D.S. Aga y E.M. Thurman, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2894.
- (83) J. Gascón y D. Barceló, *Chromatographia*, 38, 9-10 (1994) 663.



Bibliografia

- (84) U.S. Environmental Protection Agency, Status of Pesticides in Registration and Special Review (rainbow Report). EPA 738R-94-008. Washington D.C. 1994.
- (85) Ordennance sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires OSEC. Suiza. 1991.







UNIVERSIDAD DE GRANADA  
11 JUL. 1995  
COMISION DE DOCTORADO

ANEXOS





REPUBLICA DE GUAYMALA  
MAYAGUEZ DE CACERES



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Pesticida	Berenjena									
	Alem.	Belg.	España	FinL	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,02		1,00	0,50	1,00	0,02	1,50		1,00	0,50
Captan	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Carbaril	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05			0,10	
Carbofurano	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Cipermetrin	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Clorfenvinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Clorpirifos	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,05
Clorpirifos-metil	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	
Clortalonil	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,01
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Dicofol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Diflubenzuron			0,05					1,00		
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Etrimfos	0,05	0,20	0,05			0,05				
Fenamifos	0,05	0,05	0,02			0,05				
Fenitrotion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,01							
Folpet	0,10	0,10	3,00	2,00	0,10	2,00	2,00		0,10	5,00
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03
Hexaflumuron			0,05							
Imidacloprid			0,05							
Lindano	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05
Malation	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,50
Mecarban			0,01			0,05				
Metamidofos	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Metidation	0,02		0,02		0,20	0,20			0,20	0,10
Metiocarb	0,10	0,05	0,05	0,20	0,10	0,05	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		0,10	0,30	
Monocrotofos	0,05	0,10	0,02	0,10		0,02	0,05		0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,01	0,10	0,01			0,10			1,00	0,01
Piridafention			0,05							
Pirimifos-metil	0,50	0,50	0,50	1,00	2,00	0,20	0,50		1,00	0,01
Procimidona	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,01
Quinalfos	0,01		0,10	0,50		0,02	0,10			
Teflubenzuron			0,50							1,00
Tetradifon	1,50	2,00	1,00	2,00		0,05	1,50		2,00	0,01
Triazofos	0,05	0,01	0,01	0,10		0,01			0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,01



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Calabacín										
Pesticida	Alem.	Belg.	España	Finl.	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,50
Captan	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Carbaril	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05			0,10	
Carbofurano	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Cipermetrin	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,01
Clorfenvinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Clorpirifos	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Clorpirifos-metil	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
Clortalonil	0,02	0,02	0,01	0,50		1,00	3,50		1,00	
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,01
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Dicofol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Diflubenzuron			0,05							
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Etrimfos	0,05	0,20	0,05			0,05				
Fenamifos	0,05	0,05	0,02			0,05				
Fenitrotion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,01							
Folpet	0,10	0,10	0,10	2,00	0,10	2,00	2,00		0,10	0,01
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03
Hexaflumuron			0,05							
Imidacloprid			0,10							
Lindano	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05
Malation	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,50
Mecarban			0,01			0,05				
Metamidofos	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
Metidation	0,02		0,02		0,20	0,20			0,20	0,10
Metiocarb	0,10	0,05	0,05	0,20	0,10	0,10	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		0,10	0,30	
Monocrotofos	0,05	0,10	0,02	0,10		0,02			0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,01	0,10	0,10		0,10				1,00	0,01
Piridafention			0,05							
Pirimifos-metil	0,50	0,50	0,20	1,00	2,00	0,20	0,50		1,00	0,01
Procimidona	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Quinalfos	0,01		0,10	0,50		0,02				
Teflubenzuron			0,05							0,01
Tetradifon	1,50	2,00	2,00	2,00	0,20		1,50		2,00	0,01
Triazofos	0,05	0,01	0,01	0,10		0,01			0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Judía verde										
Pesticida	Alem.	Belg.	España	FinL	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,02		0,20	0,50	1,00	0,02	1,50		1,00	0,50
Captan	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	
Carbaril	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05			0,10	
Carbofurano			0,10							
Cipermetrin	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Clorfenvinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Clorpirifos	0,01	0,20	0,20	0,50	0,20	0,05			0,50	0,05
Clorpirifos-metil	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
Clortalonil	0,02	0,02	0,01	0,50		1,00	3,50		1,00	
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,01
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Dicofol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Diflubenzuron			0,05							
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Etrimfos	0,20	0,20	0,05			0,05				
Fenamifos	0,05	0,05	0,10			0,05				
Fenitrothion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,01							
Folpet	2,00	0,10	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00		2,00	0,01
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03
Hexaflumuron			0,05							
Imidacloprid			0,05							
Lindano	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05
Malation	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,50
Mecarban			0,01			0,05				
Metamidofos	0,05	0,01	0,10	0,20		0,01			0,20	
Metidation	0,02		0,02		0,20	0,20			0,20	0,10
Metiocarb	0,10	0,01	0,20	0,20	0,10	0,05	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		0,10	0,30	
Monocrotofos	0,05	0,10	0,02	0,10		0,02			0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,01	0,10	0,10			0,10			1,00	0,01
Piridafention			0,05							
Pirimifos-metil	0,50	0,50	0,50	1,00	2,00	0,20	0,50		1,00	0,01
Procimidona	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00
Quinalfos	0,01		0,10	0,50		0,02	0,10			
Teflubenzuron			0,05							0,01
Tetradifon	1,50	2,00	1,00	2,00		0,05	1,50		2,00	0,01
Triazofos	0,20	0,01	0,01	0,10		0,01			0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,01



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Melón										
Pesticida	Alem.	Belg.	España	FinL	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,50
Captan	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Carbaril	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05			0,10	
Carbofurano			0,10							
Cipermetrin	0,50	0,50	1,00			0,20			2,00	0,01
Clorfenvinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Clorpirifos	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Clorpirifos-metil	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
Clortalonil	0,02	0,02	0,01	0,50	5,00	1,00	3,50		1,00	
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,01
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Dicofol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Diflubenzuron			0,05							
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Etrimfos	0,05	0,20	0,05			0,05				
Fenamifos	0,05	0,05	0,05			0,05				
Fenitrotion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,01							
Folpet	0,10	0,10	0,10	2,00	0,10	2,00	2,00		0,10	0,01
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03
Hexaflumuron			0,05							
Imidacloprid			0,05							
Lindano	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05
Malation	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,50
Mecarban			0,01			0,05				
Metamidofos	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
Metidation	0,02		0,02		0,20	0,20	0,20		0,20	0,10
Metiocarb	0,10	0,05	0,05	0,20	0,10	0,05	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10			0,30	
Monocrotofos	0,05	0,10	0,02	0,10		0,02			0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,01	0,10	0,10		0,10	0,10	0,10		1,00	0,01
Piridafention			0,05							
Pirimifos-metil	0,50	0,50	0,20	1,00	2,00	3,00	0,50		1,00	0,01
Procimidona	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Quinalfos	0,01		0,10	0,50		0,02				
Teflubenzuron			0,05							0,01
Tetradifon	1,50	2,00	2,00	2,00	0,20	0,05	1,50		2,00	0,01
Triazofos	0,05	0,01	0,01	0,10		0,01	0,10		0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Pesticida	Pepino									
	Alem.	Belg.	España	FinL	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,02		0,30	0,50	1,00	0,02	1,50		1,00	0,50
Captan	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Carbaril	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05			0,10	
Carbofurano	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Cipermetrin	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,60
Clorfenvinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Clorpirifos	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Clorpirifos-metil	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
Clortalonil	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,01
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Dicofol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Diflubenzuron			0,05							
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Etrimfos	0,10	0,20	0,05			0,05				0,20
Fenamifos	0,05	0,05	0,05			0,05				
Fenitrothion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,01							
Folpet	0,10	0,10	0,10	2,00	0,10	2,00	2,00		0,10	0,01
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03
Hexaflumuron			0,05							
Imidacloprid			0,10							
Lindano	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05
Malation	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,50
Mecarban			0,01			0,05				
Metamidofos	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Metidation	0,02		0,02		0,20	0,20			0,20	0,10
Metiocarb	0,10	0,05	0,20	0,20	0,10	0,05	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		0,10	0,30	
Monocrotofos	0,05	0,10	0,02	0,10		0,02			0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,50	0,10	0,10		0,10	0,10	0,10		1,00	0,10
Piridafention			0,05							
Pirimifos-metil	0,50	0,50	0,20	1,00	2,00	0,20	0,50		1,00	0,01
Procimidona	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Quinalfos	0,01		0,10	0,50		0,02				
Teflubenzuron			0,20							0,30
Tetradifon	1,50	2,00	2,00	2,00	0,20	0,05	1,50		2,00	0,20
Triazofos	0,05	0,01	0,01	0,10		0,01			0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Pimiento										
Pesticida	Alem.	Belg.	España	FinL	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,02		0,50	0,50	1,00	0,02	1,50		1,00	0,50
Captan	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Carbaril	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05			0,10	
Carbofurano	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Cipermetrin	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Clorfenvinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Clorpirifos	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,05
Clorpirifos-metil	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	
Clortalonil	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,01
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Dicofol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Diflubenzuron			0,05					1,00		
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Etrimfos	0,05	0,20	0,05	0,20		0,05				
Fenamifos	0,05	0,05	0,10			0,05				
Fenitrothion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,01							
Folpet	0,10	0,10	0,10	2,00	0,10	2,00	2,00		0,10	0,01
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03
Hexaflumuron			0,50							
Imidacloprid			0,50							
Lindano	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05
Malation	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,50
Mecarban			0,01			0,05				
Metamidofos	1,00	0,01	1,00	0,20		0,01			0,20	
Metidation	0,02	0,20	0,02		0,20	0,20			0,20	0,10
Metiocarb	0,10	0,05	1,00	0,20	0,10	0,05	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		0,10	0,30	
Monocrotofos	0,05	0,10	0,02	0,10		0,02			0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,01	0,10	0,20	0,20		0,10			1,00	0,01
Piridafention			0,05							
Pirimifos-metil	0,50	0,50	1,00	1,00	2,00	0,20	0,50		1,00	0,01
Procimidona	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,01
Quinalfos	0,01		0,10	0,50		0,02	0,10			
Teflubenzuron			0,50							0,01
Tetradifon	1,50	2,00	1,00	2,00			1,50		2,00	0,01
Triazofos	0,05	0,01	0,01	0,10		0,01			0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,01



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Pesticida	Tomate									
	Alem.	Belg.	España	Finl.	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Captan	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	
Carbaril	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05			0,10	
Carbofurano	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Cipermetrin	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,60
Clorfenvinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
Clorpirifos	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,05
Clorpirifos-metil	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	
Clortalonil	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,50
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,01
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Dicofol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,01
Diflubenzuron			0,05					1,00		
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01
Etrimfos	0,20	0,20	0,20			0,05				0,20
Fenamifos	0,20	0,05	0,10			0,05				
Fenitrotion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,01							
Folpet	3,00	3,00	3,00	2,00	3,00	5,00	5,00		3,00	3,00
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03
Hexaflumuron			0,05							
Imidacloprid			0,10							
Lindano	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,05
Malation	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,50
Mecarban			0,01			0,05				
Metamidofos	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	
Metidation	0,02		0,02		0,20	0,20	0,20		0,20	0,10
Metiocarb	0,10	0,05	0,20	0,20	0,10	0,05	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		0,10	0,30	
Monocrotofos	0,05	0,10	0,02	0,10		0,02	0,05		0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,01	0,10	0,20			0,10			1,00	0,01
Piridafention			0,20							
Pirimifos-metil	1,00	1,00	0,50	1,00	2,00	0,20	0,50		1,00	0,01
Procimidona	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Quinalfos	0,01		0,10	0,50		0,02	0,10			
Teflubenzuron			0,50							1,00
Tetradifon	1,50	2,00	1,00	2,00		0,05	1,50		2,00	0,01
Triazofos	0,05	0,01	0,01	0,10		0,01			0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	1,00



## Anexo I: LMRs de los pesticidas estudiados en diferentes países

Uva										
Pesticida	Alem.	Belg.	España	Finl.	Franc.	Holan.	Italia	R.U.	Suecia	Suiza
Acefato	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,50
Captan	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	15,00
Carbaril	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	
Carbofenotion	0,01	0,05	0,02	0,10		0,05	0,50		0,10	
Carbofurano	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
Cipermetrin	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	1,00
Clorfenvinfos	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
Clorpirifos	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Clorpirifos-metil	0,01		0,20	0,10	0,20	0,02	0,20		0,20	
Clortalonil	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Diclofluanida	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	1,00
Diclorvos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Dicofol	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Diflubenzuron			0,05							
Dimetoato	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50
Endosulfan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,10
Etrimfos	0,50	0,10	0,10		0,10	0,05				0,20
Fenamifos	0,10	0,10	0,10			0,10				
Fenitrotion	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10
Flufenoxuron			0,10							
Folpet	3,00	3,00	3,00	2,00	3,00	25,00	15,00		3,00	15,00
Fosalone	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00
Hexaflumuron			0,05							
Imidacloprid			0,05							
Lindano	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,05
Malation	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Mecarban			0,20	0,10		0,05				
Metamidofos	0,05	0,01	0,01	0,20	0,30	0,01	0,15		0,20	
Metidation	0,50		0,50		0,20	0,20	0,20		0,20	0,20
Metiocarb	0,10	0,05	0,05	0,20	0,10	0,05	0,05		0,20	0,05
Mevinfos	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		0,10	0,30	0,30
Monocrotofos	0,05	0,20	0,02	0,10	0,20	0,05	0,05		0,10	
Naled	0,20	0,02	0,20	0,20	0,20	0,02	0,20			
Ometoato	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
Paration-metil	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50
Pirazofos	0,01	0,10	0,01			0,10	0,10		1,00	0,01
Piridafention			0,20							
Pirimifos-metil	0,05	0,50	0,50	1,00	2,00	0,20	0,50		1,00	0,01
Procimidona	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Quinalfos	0,01		0,30	0,50		0,02	0,10			0,10
Teflubenzuron			0,50							0,30
Tetradifon	1,50	2,00	2,00	2,00	2,00	0,05	1,50		2,00	3,00
Triazofos	0,05	0,10	0,01	0,10		0,01			0,10	
Triflumuron			0,05							
Vinclozolina	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00



**Anexo II. Abreviaturas utilizadas en el texto.**

**AcN:** Acetonitrilo.

**BPU:** Benzoilfenilureas.

**CY:** Coeficiente de variación.

**DAD:** Detector de diodos array.

**ECD:** Detector de captura electrónica.

**EFS:** Extracción en fase sólida.

**e.m.:** Nivel de concordancia de espectros (spectra match).

**FO:** Función objetiva.

**FPD:** Detector fotométrico de llama.

**GC:** Cromatografía de gases.

**GPC:** Cromatografía de permeación en gel.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.

**IE:** Impacto electrónico.

**LMRs:** Límites máximos de residuos.

**MMRs:** Métodos multirresiduos.

**MS:** Espectrometría de masas.

**NMCs:** N-Metilcarbamatos.

**NPD:** Detector de Nitrógeno-Fósforo.

**OCs:** Organoclorados.

**OPA:** O-ftalaldehido.

**OPs:** Organofosforados.

**PVDF:** Di-fluoruro de polivinilideno.

**SIM:** Monitorización de iones seleccionados.

**SP:** Espectrofotómetro.

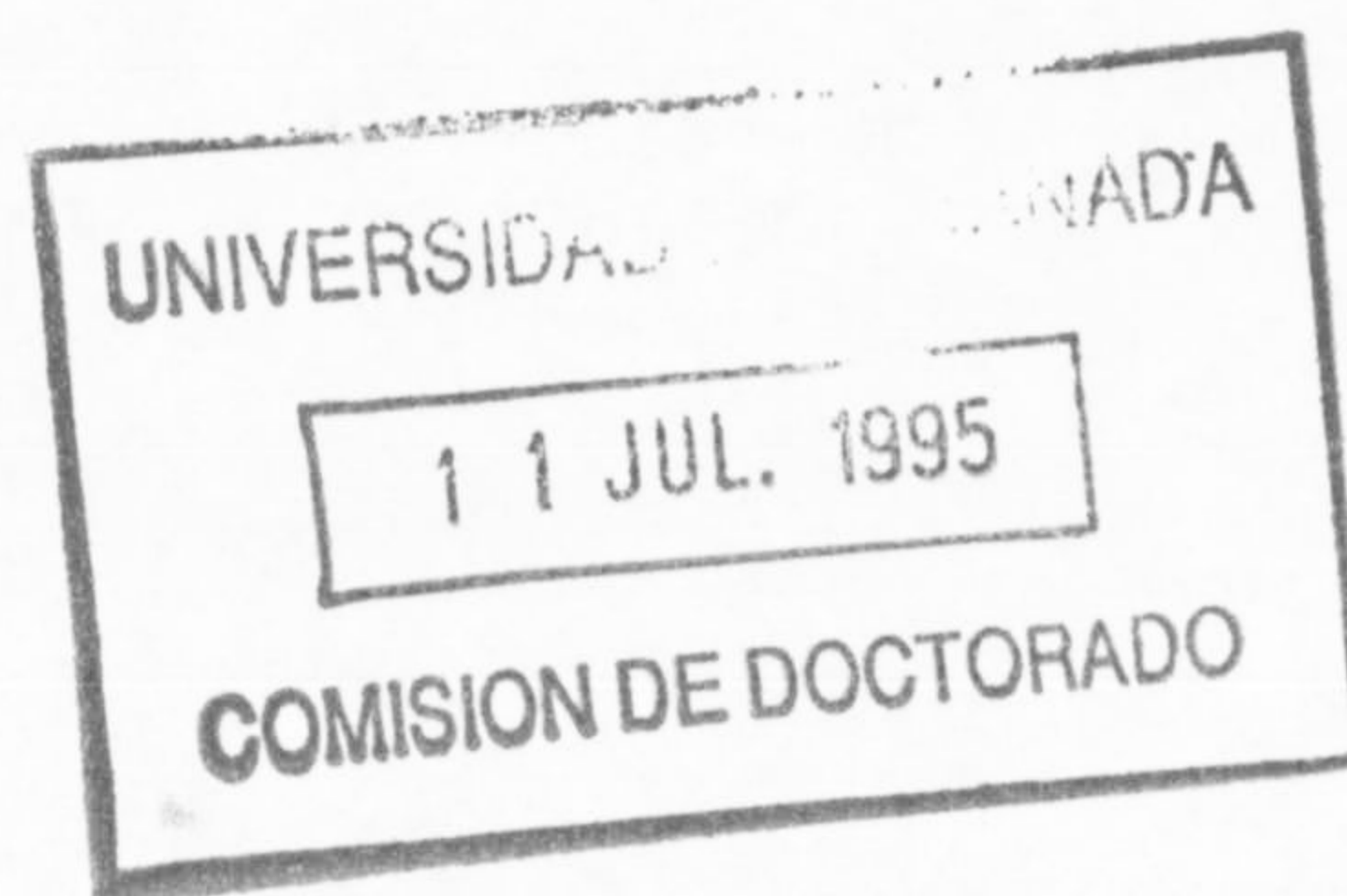
**TPP:** Trifenilfosfato.

**TR:** Tiempo de retención.

**TRR:** Tiempo de retención relativo.

**TSP:** Termospray.

**UV:** Ultravioleta.





COMISSÃO DE LICITAÇÃO Nº 001/2007  
11.11.2007  
RUA DE SÃO CARLOS, 150 - JARDIM SÃO CARLOS - SÃO PAULO - SP