

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE GRANADA



Departamento de Química Analítica

**DETERMINACIÓN DE CARBAMATOS EN ZUMO MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR EMPLEANDO LÍQUIDOS IÓNICOS**

CARMEN TEJADA CASADO

Granada, 2013

DETERMINACIÓN DE CARBAMATOS EN ZUMO MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EMPLEANDO LÍQUIDOS IÓNICOS

Memoria del Trabajo Fin de Máster por Carmen Tejada Casado

Los Directores de la Memoria,

Fdo. Dra. Ana M. García Campaña
**Catedrática del Dpto. de
Química Analítica de la
Universidad de Granada**

Fdo. Dra. Monsalud del Olmo Iruela
**Profesora del Dpto. de
Química Analítica de la
Universidad de Granada**

Granada, 2 de Julio de 2013

ÍNDICE



ÍNDICE

1.	LÍNEA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETO DE LA MEMORIA	9
1.1.	Línea de investigación	11
1.2.	Objeto de la memoria	11
2.	INTRODUCCIÓN	13
2.1.	Plaguicidas: generalidades y clasificación	15
2.2.	Carbamatos	18
2.2.1.	Estructura y propiedades físico-químicas de los carbamatos	19
2.2.2.	Actividad de los carbamatos	25
2.2.3.	Distribución y transporte en el medio ambiente	26
2.3.	Interés y legislación sobre el control de residuos de plaguicidas en alimentos	29
2.4.	Electroforesis capilar	32
2.4.1.	Electroforesis capilar con detección UV-Vis	35
2.4.2.	Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)	37
2.5	Líquidos iónicos: Descripción y aplicaciones	39
2.6	Tratamientos de muestra para la determinación de carbamatos	42
2.6.1.	Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)	42
3.	Experiemental	45
3.1.	Reactivos, disoluciones, material y muestras	47
3.2.	Instrumentación y software	48
3.3.	Procedimiento electroforético propuesto	49
3.4.	Tratamiento de muestra mediante DLLME	50
4.	Resultados y Discusión	53
4.1.	Optimización de la separación electroforética	55
4.1.1.	Optimización del pH y naturaleza del tampón	55
4.1.2.	Optimización de la concentración de tampón	58

4.1.3.	Optimización de la naturaleza y concentración del líquido iónico	59
4.1.4.	Utilización de modificadores orgánicos	61
4.1.5.	Optimización del voltaje	62
4.1.6.	Optimización de la temperatura	63
4.1.7.	Optimización de los tiempos de inyección	63
4.1.8.	Estrategias para incrementar la sensibilidad: preconcentración en el capilar y empleo de capilar burbuja	64
4.1.9.	Resumen de optimización de variables y elección de carbamatos para el análisis	67
4.2.	Optimización del tratamiento de muestra: microextracción líquido-líquido dispersiva	69
4.2.1.	Optimización de la naturaleza del disolvente extractante	70
4.2.2.	Optimización de la naturaleza del disolvente dispersante	71
4.2.3.	Optimización del pH	71
4.2.4.	Diseño de experimentos para la optimización de los volúmenes	72
5.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ZUMO	75
5.1.	Parámetros de calidad del métodos	77
5.2.	Estudio de la precisión	79
5.3.	Estudio de la veracidad	79
6.	CONCLUSIONES	83
7.	ABREVIATURAS	87

1. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETO DE LA MEMORIA



1.1 LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

El trabajo ha sido desarrollado dentro de la línea de investigación “DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS CONTAMINANTES EN DIVERSOS TIPOS DE ALIMENTOS”, perteneciente al Grupo de Investigación “*Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica (FQM-302)*”, cuya responsable es la Dra. Ana M^a García Campaña y ha sido realizado bajo la dirección de las Dras. Monsalud del Olmo Iruela y Ana M^a García Campaña.

1.2 Objeto de la memoria

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un nuevo método de análisis sensible y selectivo para un grupo de plaguicidas pertenecientes a la familia de los carbamatos (CRBs).

Al ser la mayoría de los CRBs neutros hasta valores de pH bastante elevados, ha sido necesario recurrir al empleo de la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), basada en la formación de micelas en el tampón electroforético para conseguir la separación de este tipo de compuestos no cargados. Para ello se ha introducido un líquido iónico, (1-Dodecil-3-metilimidazoliumtetrafluoroborato), como medio organizado alternativo a los más comúnmente empleados en electroforesis capilar como son los surfactantes dodecil sulfato sódico (SDS) y bromuro cetiltrimetil amonio (CTAB).

Para el tratamiento de muestra se hace uso de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), la cual presenta la ventaja de ser eficaz, rápida y sencilla, además de reducir el consumo de disolventes orgánicos y de residuos. El procedimiento propuesto será caracterizado y validado para una matriz alimentaria, concretamente zumos de frutas.

2. INTRODUCCIÓN



2.1 Plaguicidas: generalidades y clasificación

Edad Antigua

Hasta finales del siglo XIX

Egipto



Grecia





1ª GENERACIÓN

"Papiro de Eber" donde se describe la preparación de varias sustancias que se emplean para repeler insectos.

Homero menciona la utilidad del azufre quemado como fumigante (La Odisea, Capítulo XXII).

Compuestos derivados del arsénico, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc y plomo, etc, son empleados para luchar contra las plagas.

Principios del siglo XX hasta la actualidad

2ª GENERACIÓN



Los avances de la ciencia y de la industria química hicieron posible la aparición de plaguicidas más eficaces. Estos plaguicidas se pueden clasificar según su estructura química. Las tres familias más importantes son los organofosforados, los carbamatos y los organoclorados, incluido el DDT.

En 1939 el químico suizo Müller descubrió las propiedades del DDT como veneno para los insectos. Recibe el Nobel en 1948. Se calcula que el DDT salvó a 5 millones de personas en sus primeros años de uso ya que se evitó la pérdida de las cosechas y la consiguiente hambruna.

En 1970 el uso del DDT se prohíbe debido a sus efectos secundarios para el medioambiente y la salud, lo que puso de manifiesto que el uso de plaguicidas debía ser regulado.

Empleo de la ingeniería genética







3ª, 4ª y 5ª GENERACIÓN

Su uso todavía no está muy extendido.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define “plaguicida” como cualquier material fabricado o formulado con el fin de destruir alguna plaga [1]. Los herbicidas, fungicidas, insecticidas y acaricidas son, por tanto, plaguicidas. El uso de los plaguicidas está mundialmente extendido y su utilización ha contribuido a la mejora en la producción de las cosechas y a la disminución de la hambruna. Sin embargo, y paralelo a su uso, se han comprobado los numerosos efectos adversos sobre la salud de los consumidores y, sobre todo, de los trabajadores que los aplican, producen o manipulan. La industria química ha ido buscando siempre mejorar la relación efectividad-toxicidad; sin embargo, en la actualidad no existe todavía el plaguicida ideal.

Los plaguicidas se pueden clasificar en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la estructura química y su uso [2]. Así, en 1978, la OMS estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}) que es la estimación estadística de la cantidad de una sustancia tóxica ($mg\ kg^{-1}$) por peso corporal, necesaria para matar al 50% de animales de experimentación en los que se ensaya el efecto letal de la sustancia, administrándola por vía oral o dérmica, durante un período de tiempo determinado y seguimiento en un período post-exposición. Esta clasificación, recogida en la tabla 1, es periódicamente evaluada, siendo la última versión la de 2009 [3]. En ella se clasifica a los plaguicidas en cuatro clases atendiendo a su grado de toxicidad.

[1] Adaptado de la página web de la FAO. Junio 2013

<http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm#E10E3>.

[2] J.A. Ramírez, M. Lacasaña, *Arch. Prev. Riesgos Labor.* 4 (2001) 67.

[3] “The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification” from WHO Press, World Health Organization 2009. ISBN 978 92 4 154796 3

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL₅₀ (mg kg⁻¹).

Clase	Toxicidad	DL ₅₀
Clase IA	Extremadamente peligrosos	0-5 mg kg ⁻¹
Clase IB	Altamente peligrosos	5-50 mg kg ⁻¹
Clase II	Moderadamente peligrosos	50-500 mg kg ⁻¹
Clase III	Ligeramente peligrosos	mayor de 500 mg kg ⁻¹

Los plaguicidas se pueden clasificar además teniendo en cuenta el tipo de plaga a la que se dirige principalmente su acción [4].

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas en función del tipo de plaga que controlan.

Tipo	Acción principal
Insecticidas	Control de insectos
Fungicidas	Control de hongos causantes de enfermedades
Herbicidas	Luchan contra las malas hierbas, ya sea de un modo general o selectivo, es decir, dejando indemne el cultivo y destruyendo todas o buena parte de las hierbas adventicias (malas hierbas)
Acaricidas	Combaten la araña roja y los ácaros
Nematicidas	Control de nemátodos
Molusquicidas	Control de babosas y caracoles
Rodenticidas	Control de roedores (ratas, ratones, topillos, etc)
Desinfectantes del suelo	Su acción se extiende a nemátodos, insectos, hongos y malas hierbas que se encuentran en los suelos destinados a cultivo
Antibióticos de uso agrícola	Luchan contra las bacteriosis propias de los cultivos
Reguladores fisiológicos	Aceleran o retardan el crecimiento, estimulan la floración o fructificación o cambian en alguna forma el comportamiento normal de las plantas
Repelentes	Usados para ahuyentar las plagas
Atrayentes	Usados para atraer las plagas (generalmente a trampas)
Defoliantes	Provocan la caída de las hojas sin matar las plantas

Por otra parte, de acuerdo a su estructura química los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen los compuestos organoclorados, organofosforados,

[4] Adaptado de la página web de la EPA (Environmental Protection Agency) . Junio 2013
<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>

carbamatos, etc. En la siguiente tabla se recogen las familias de compuestos más importantes y su acción principal [5].

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su estructura química.

Tipo	Principal uso
Organoclorados	Insecticida
Organofosforados	Insecticida
Carbamatos	Insecticida
Derivados del ácido carboxílico	Herbicida
Triazinas	Herbicida
Ureas sustituidas	Herbicida
Piretroides	Insecticida
Organometálicos	Funguicida
Tiocianatos	Insecticida
Fenoles	Insecticida

En el siguiente apartado se comentarán algunos aspectos relevantes de los CRBs, que han sido los plaguicidas seleccionados para el desarrollo de este trabajo de investigación.

2.2 Carbamatos

La actividad biológica de los CRBs se descubrió en 1923, al describirse por primera vez la estructura del alcaloide eserina (o fisostigmina) contenido en la nuez de Eseré [6]. En 1929 se sintetizaron análogos de fisostigmina, y pronto se pudo disponer de derivados del ácido ditiocarbámico tales como tiram y ziram. El estudio de los compuestos carbámicos comenzó el mismo año, y ahora se conocen más de 1.000 derivados del ácido carbámico. De ellos, más de 50 se utilizan como plaguicidas (herbicidas, fungicidas y nematocidas). En 1947 se sintetizaron los primeros productos de esta clase dotados de propiedades insecticidas.

[5] H.S. Rathore, en "Handbook of pesticides, Methods of pesticide residues analysis", 1ª Ed. CRC Press 2010, p. 8.

[6] D. Osindky, J.M. Stellman en "Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo", 3ª Ed., Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales (1998).

Algunos CRBs han demostrado ser eficaces como aceleradores de la vulcanización, y se han utilizado derivados en el tratamiento de tumores malignos, hipoxia, neuropatías, heridas por radiación y otras enfermedades. También se utilizan como plaguicidas aril ésteres del ácido alquilcarbámico y alquil ésteres del ácido arilcarbámico [7].

2.2.1 Estructura y propiedades físico-químicas de los carbamatos

Los CBRs tienen la estructura común mostrada en la Figura 1.

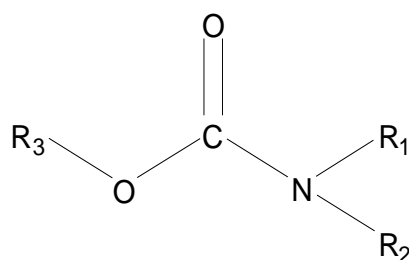


Figura 1. Estructura general de los carbamatos.

En función de la naturaleza de los sustituyentes, los CRBs presentan diversas acciones, dando lugar a la clasificación mostrada en la Tabla 4. Además, la sustitución de uno o los dos oxígenos por azufre, hace que disminuya su actividad insecticida [8].

Tabla 4. Clasificación de los CRBs.

Tipo	Sustituyentes	Acción
Metilcarbamatos	R ₁ grupo metilo, R ₂ hidrógeno y R ₃ grupo aromático o alifático	Insecticida
Carbamatos	R ₁ grupo aromático, R ₂ hidrógeno y R ₃ grupo aromático o alifático	Fungicida
Ditiocarbamatos	R ₁ grupo aromático, R ₂ hidrógeno y R ₃ grupo aromático o alifático; los dos oxígenos se sustituyen por azufre	Fungicida
Tiocarbamatos	R ₁ grupo aromático o alifático, R ₂ hidrógeno y R ₃ grupo benzimidazol; uno de los dos oxígenos se puede sustituir por azufre	Herbicida
Fenilcarbamatos	R ₁ grupo aromático o alifático, R ₂ hidrógeno y R ₃ grupo benzimidazol	Herbicida

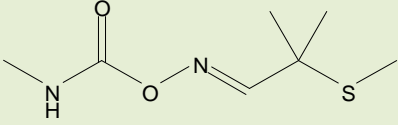
[7] N.E.I S. de Nudelman, en "Química sustentable", 1ª Ed., Universidad Nac. del Litoral (2004).

[8] R.J. Flanagan, R.A. Braithwaite, S.S. Brown, B. Widdop, F.A. de Wolff, "Basic Analytical Toxicology", World Health Organization, Geneva (1995).

En general, los ésteres simples o derivados N-sustituidos del ácido carbámico, son compuestos inestables, especialmente bajo condiciones alcalinas. Las sales y ésteres del ácido carbámico son más estables que el ácido. Este incremento de la estabilidad es la base de la síntesis de muchos derivados que actúan como plaguicidas.

En cuanto a su solubilidad, los ésteres de carbamato son sólidos cristalinos de baja presión de vapor, con solubilidades variables, pero normalmente bajas en disoluciones acuosas. En general, son escasamente solubles en disolventes no polares, pero muy solubles en disolventes polares orgánicos como metanol, etanol, acetona, dimetilformamida, etc.

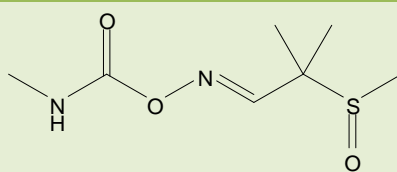
A continuación se muestran las propiedades físico-químicas de los CRBs que han sido estudiados en la presente memoria. Los datos se han obtenidos de diversas bases de datos como Scifinder [9] o Chemfinder [10].

Aldicarb (ALD)	
	
Nombre químico:	2-Metil-2-(metiltio)propionaldehído-O-metilcarbamoiloxima
pKa:	13.8
Peso molecular:	190.26 g/mol

[9] Adaptado de la página web de Scifinder. Junio 2013
<https://scifinder.cas.org>

[10] Adaptado de la página web de Chemfinder. Junio 2013
<http://chembionews.cambridgesoft.com/>

Aldicarb sulfóxido (ALDSFX)

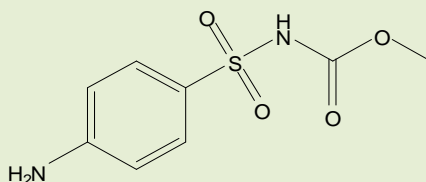


Nombre químico: 2-Metil-2-(metilsulfonil)propionaldehído-O-metilcarbamoiloxima

pKa: 13.5

Peso molecular: 206.26 g/mol

Asulam (ASL)

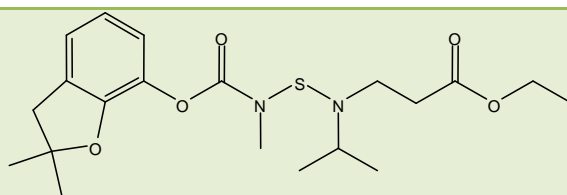


Nombre químico: Metil-N-(4-aminofenilsulfonilo)carbamato

pKa: 1.4 y 4.6

Peso molecular: 230.24 g/mol

Benfuracarb (BF)

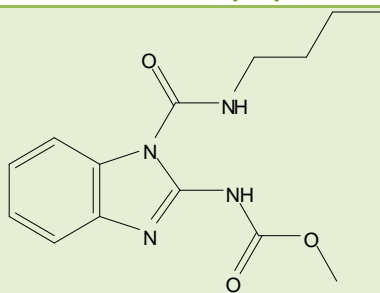


Nombre químico: N-2,3-dihidro-2,2-dimetilaminotiol-N-isopropil-β-alanilato de metilo

pKa: 2.1

Peso molecular: 410.53 g/mol

Benomil (BY)

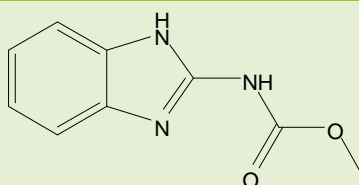


Nombre químico: Metil-1-(butilcarbamoil)bencimidazol-2-il carbamato

pKa: 3.5 y 11.7

Peso molecular: 290.32 g/mol

Carbendazima (CBZ)

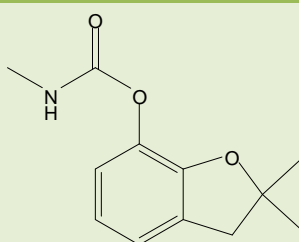


Nombre químico: Metil benzimidazol-2-ilcarbamato

pKa: 5.6 y 11.6

Peso molecular: 191.19 g/mol

Carbofurano (CF)

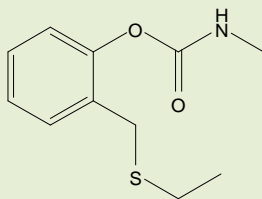


Nombre químico: 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato

pKa: 12.3

Peso molecular: 221.25 g/mol

Etiofencarb (ETH)

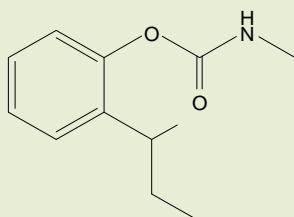


Nombre químico: (2-etiltiometil-fenil)-n-metilcarbamato

pKa: 12.1

Peso molecular: 225.31 g/mol

Fenobucarb (FEN)

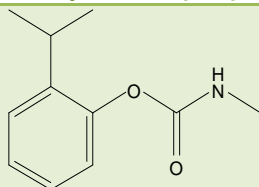


Nombre químico: 2-(1-metilpropil)fenil metilcarbamato

pKa: 12.2

Peso molecular: 207.27 g/mol

Isoprocarb (ISP)

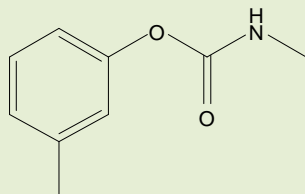


Nombre químico: 2-(1-Metiletil)-fenol metilcarbamato

pKa: 12.2

Peso molecular: 193.24 g/mol

Metolcarb (MTL)

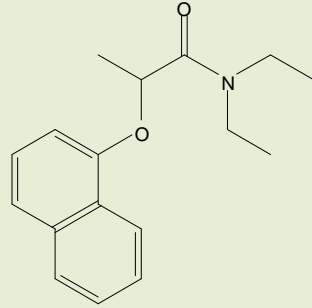


Nombre químico: 3-metilfenil metilcarbamato

pKa: 12.4

Peso molecular: 165.19 g/mol

Napropamida (NP)

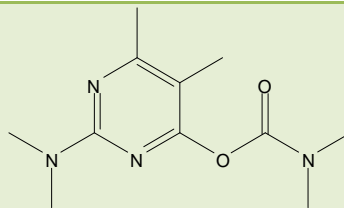


Nombre químico: N,N-dietil-2-(1-naftiloxi)propionamida

pKa: ----

Peso molecular: 271.35 g/mol

Pirimicarb (PRC)

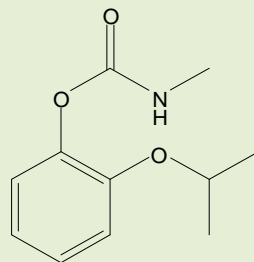


Nombre químico: 2-dimetilamino-5,6-dimetilpirimidin-4-il dimetilcarbamato

pKa: 5.6 y 9.0

Peso molecular: 238.29 g/mol

Propoxur (PX)

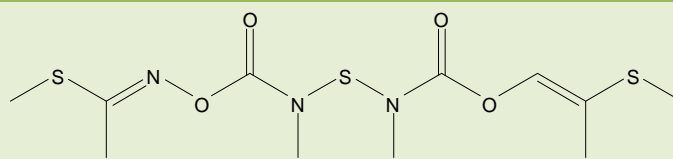


Nombre químico: 2-isopropoxifenil metilcarbamato

pKa: 12.3

Peso molecular: 209.24 g/mol

Tiodicarb (TH)



Nombre químico: 3,7,9,13-tetrametil-5,11-dioxa- 2,8,14-tritia-4,7,9,12-tetra-azapentadeca-3,12-dien-6,10-diona

pKa: ----

Peso molecular: 354.47 g/mol

Como se puede observar la mayoría de los CRBs presentan un valor de pKa muy extremo, permaneciendo neutros hasta valores de pH muy altos e incluso en algunos casos no se llegan a disociar.

2.2.2 ACTIVIDAD DE LOS CARBAMATOS

Los CRBs se emplean comúnmente como insecticidas, debido a su efecto neurotóxico como inhibidores reversibles de la enzima colinesterasa, siendo mortales a dosis elevadas. Sus características principales son alta toxicidad, estabilidad baja y nula acumulación en tejidos finos orgánicos. Afectan a los mamíferos a través de la piel, vía respiratoria y vía digestiva.

Según su modo de acción, los CRBs se pueden clasificar en dos grupos principales [11,12,13]:

- a) Inhibidores de la enzima colinesterasa, entre ellos metilcarbamatos y dimetilcarbamatos, que se emplean fundamentalmente como insecticidas (tanto de contacto como sistémicos), pero también como miticidas, roenticidas y nematocidas.

[11] A. Tunek, L.Å. Svensson, *Drug Metab. Dispos.* 16 (1988) 759.

[12] W. Luo, Q.S. Yu, S.S. Kulkarni, D.A. Parrish, H.W. Holloway, D. Tweedie, A. Shafferman, D.K. Lahiri, A. Brossi, N.H. Greig, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 2174.

[13] S. Darvesh, K.V. Darvesh, R.S. McDonald, D. Mataija, R. Walsh, S. Montana, O. Lockridge, E. Martin, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 4200.

- b) Inhibidores de la enzima colinesterasa por carbamitación del sitio esteárico de la enzima, e inhibidores de la acetilcolinesterasa ya que impiden su desesterificación, como los metilcarbamatos y dimetilcarbamatos.

Además de los efectos sobre la acetilcolinesterasa y la colinesterasa, los CRBs también pueden provocar disfunción del sistema reproductivo y endocrino, al afectar a las concentraciones en sangre de las hormonas implicadas en el metabolismo y en la reproducción [14,15]. En general, los síntomas producidos por la exposición del organismo a la acción de los CRBs incluyen fatiga, dolor en las articulaciones y muscular, efectos sobre el sueño, dolor de cabeza, afecciones cutáneas, efectos cognitivos y neurológicos.

2.2.3 Distribución y transporte en el medio ambiente

La distribución y el transporte de los CRBs desde el lugar donde se han empleado hasta llegar a afectar a diversos ecosistemas dependen de sus propiedades físico-químicas, así como del lugar donde se han empleado dichos CRBs.

En la Figura 2 se muestran las principales vías de contaminación por plaguicidas, así como los procesos de transporte y de transformación que pueden sufrir los mismos.

[14] D. J. Ecobichon, "Carbamate Insecticides" en "Handbook of Pesticide Toxicology", 2a Ed., Academic Press (2001). P 1087.

[15] N.C. Rawlings, S.J. Cook, D.N.C Waldbillig, *J. Toxicol. Environ. Health* 54 (1998) 21.

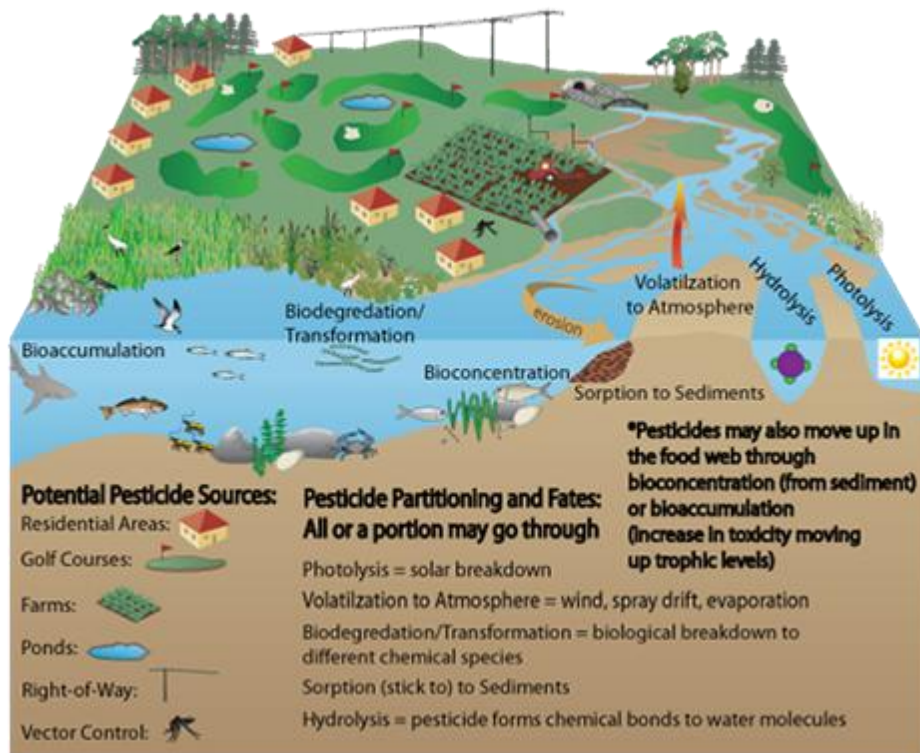


Figura 2. Contaminación por residuos de plaguicidas (fuentes y ecosistemas afectados) [16].

En general, la presión de vapor de los CRBs es baja. Sin embargo, pueden evaporarse o sublimar lentamente a temperatura ambiente, lo que puede dar lugar a la volatilización de los CRBs contenidos en el agua o el suelo. En cualquier caso, la distribución por vía aérea es minoritaria, mientras que el agua es una importante ruta de distribución para los CRBs solubles en ésta. La absorción de luz característica de los CRBs contribuye a su rápida descomposición (por fotodegradación o fotodescomposición) en medio acuoso. Por tanto, el riesgo de contaminación a largo plazo por parte de los CRBs es pequeño [17].

Los CRBs con propiedades insecticidas se emplean fundamentalmente en tratamientos agrícolas, por lo que pueden alcanzar el suelo, mientras que los nematocidas y herbicidas se aplican directamente sobre éste. Hay varios factores que pueden influenciar la biodegradación de los CRBs en el suelo, como su volatilidad, el tipo de suelo, la humedad de éste, adsorción, pH, temperatura y fotodescomposición.

[16] Adaptado de la página web de la AESAN. Junio 2013

http://sccoastalpesticides.org/knowledgebase/pesticide_movement_in_the_environment.php

[17] Environmental Health Criteria 64, Carbamate Pesticides: a General Introduction, World Health Organization, Geneva, International Programme on Chemical Safety, (1986),

Ya que los distintos CRBs presentan a su vez propiedades diferentes, cada uno de ellos deberá ser evaluado individualmente, sin poder extrapolar los resultados de unos a otros. Así, mientras algunos CRBs se descomponen con facilidad, otros pueden ser fuertemente adsorbidos en el suelo o pasar fácilmente del suelo al agua, y en este proceso el tipo de suelo y la solubilidad del CRB juegan un papel muy importante. Más aún, hay que tener en cuenta que todo lo anterior no sólo es aplicable al compuesto original, sino también a sus productos de degradación o metabolitos, ya que debido a los procesos de biotransformación, se generan en muchos casos metabolitos tóxicos con capacidad de acumulación similar a la del compuesto de partida [17,18,19].

Las condiciones medioambientales que favorecen el crecimiento de microorganismos también favorecen la degradación de los CRBs. El primer paso en la degradación metabólica de los CRBs en suelo es su hidrólisis, y los productos de esta hidrólisis serán posteriormente metabolizados en el sistema suelo-planta por la acción de microorganismos, plantas y animales o por ruptura en el agua o suelo. Así, los microorganismos del suelo son capaces de metabolizar (hidrolizar) CRBs y pueden adaptarse fácilmente a la metabolización de diversos tipos de CRBs. Sin embargo, los CRBs y sus metabolitos pueden, a dosis elevadas, afectar a la microflora y causar cambios que pueden afectar a la productividad del suelo [17].

Aunque los CRBs no son muy estables en medios acuosos, y no persisten durante mucho tiempo en el ambiente, pueden producirse efectos bioacumulativos en peces, debido a que el metabolismo en estos animales es muy lento. Así, algunos CRBs se metabolizan rápidamente sin efectos acumulativos, mientras que otros son altamente tóxicos para invertebrados y peces [17].

[18] S. Morais, E. Dias, M.L. Pereira “Carbamates: Human Exposure and Health Effects” en “The Impact of Pesticides”, 1a Ed., AcademyPublish.org (2012) p.21.

[19] J.L. Martínez Vidal, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6767.

2.3 Interés y legislación sobre el control de residuos de plaguicidas en alimentos

La utilización de plaguicidas en las cosechas puede conllevar la presencia de residuos en los alimentos derivados, esto es, restos de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción. Los plaguicidas son indudablemente uno de los grupos de compuestos químicos mejor regulados y controlados en la sanidad alimentaria. Así, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN) incluye a los plaguicidas entre los factores de peligro para la seguridad alimentaria, siendo factor de peligro todo agente biológico, químico o físico presente en un alimento o un pienso o toda condición biológica, química o física de un alimento o de un pienso que pueda causar un efecto perjudicial para la salud [20].

No obstante, a pesar de los estrictos controles ejercidos por las diversas autoridades, surgen permanentemente nuevas situaciones de alarma alimentaria y social que tienen importantes implicaciones en el comercio internacional. En la Unión Europea (UE), una herramienta clave para reaccionar con rapidez ante los incidentes registrados en el ámbito de los alimentos y los piensos es el RASFF (sistema de alerta rápida para alimentos y piensos), que permite que las diferentes organizaciones intercambien información de forma rápida y eficiente en caso de detectarse un riesgo para la salud y evitar así que perjudique a los consumidores. Como se ve en la Figura 3 el número de alertas relacionadas con plaguicidas ha ido aumentando en los últimos años, lo que pone de manifiesto la problemática que presentan estos compuestos en la actualidad.

[20] Adaptado de la página web de la AESAN. Junio 2013

<http://www.aesan.msc.es/>

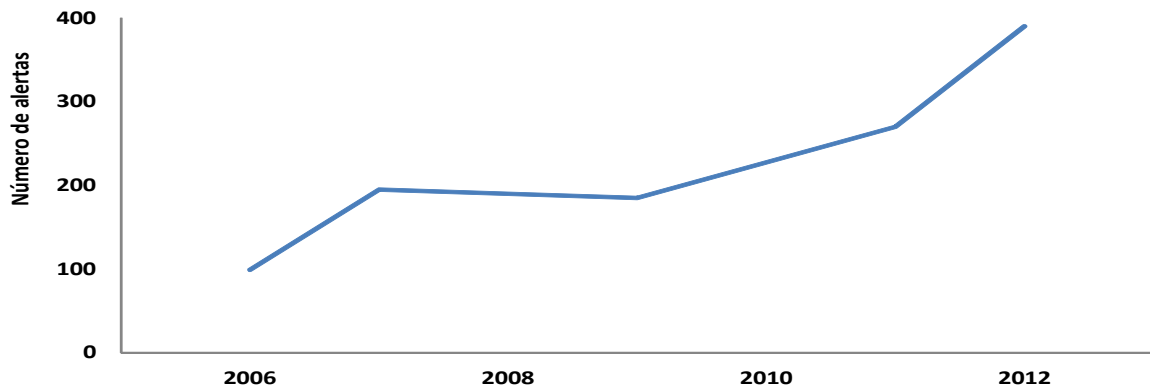


Figura 3. Número de alertas relacionadas con plaguicidas en los últimos años [21].

En 1979 se introdujeron por primera vez en la UE actos legislativos y medidas relacionadas con los plaguicidas, y desde entonces han ido evolucionando considerablemente, hasta culminar en 1991 con la adopción de una directiva sobre la comercialización de productos fitosanitarios [22].

Asimismo, con el fin de asegurar que la utilización de estas sustancias químicas es segura para los consumidores se han establecido límites máximos de residuos (MRL) para diversos plaguicidas en diferentes alimentos, definidos como la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg kg^{-1}) [23], recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius, para que se permita legalmente su uso en la superficie o la parte interna de productos alimenticios para consumo humano y de piensos.

[21] Adaptado de la página web de la Comisión Europea. Junio 2013

http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2011_en.pdf

[22] Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios Diario Oficial nº L 230 de 19/08/1991 p. 0001 - 0032

[23] Reglamento (CE) no 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo Diario Oficial nº L 070 de 16/03/2005 p. 0001 - 0016

Los MRLs no son límites toxicológicos, sino que son límites toxicológicamente aceptables, basados en una buena práctica agrícola y que representan la cantidad máxima de un residuo que es posible encontrar en un producto alimentario de origen vegetal y animal como consecuencia del uso legal y racional del plaguicida evaluado. Según la AESAN [24]:

- Los MRLs no son límites toxicológicos porque no representan la cantidad máxima de esa sustancia activa que puede ser perjudicial para la salud de los consumidores. Es decir, la superación de un MRL no implica necesariamente la existencia de un riesgo para la salud.
- Los MRLs son toxicológicamente aceptables porque su cumplimiento asegura que no producen efectos tóxicos en los individuos, ni a corto ni a largo plazo.

La UE, a través de un reglamento comunitario, fijó en 2005 los MRLs de sustancias activas (incluidos plaguicidas) que pueden aparecer en piensos y alimentos [25]. De forma periódica este reglamento ha ido sufriendo modificaciones en forma de anexos [26] incluyendo nuevas sustancias que han de ser controladas en diferentes productos. Para un fácil entendimiento de la legislación vigente, existe una base de datos de la UE, donde están todas las sustancias legisladas y sus correspondientes LMR [27].

Como consecuencia de esta armonización de los MRLs en todo el territorio de la UE, se ha logrado paralelamente la eliminación de las barreras comerciales de los productos vegetales y animales.

[24] Adaptado de la página web de la AESAN. Junio 2013

http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/legislacion/subdetalle/residuos_plaguicidas.shtml

[25] Reglamento (CE) N^o. 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Comunidad Europea*, N^o. L 70, 16 de Marzo de 2005, pp. 1–16.

[26] Reglamento (CE) N^o. 600/2010 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 8 de julio de 2010, por el que se modifica el anexo 1 del Reglamento N^o. 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo a fin de añadir y modificar ejemplos de variedades u otros productos relacionados a los que se aplica un mismo LMR. . *Diario Oficial de la Comunidad Europea*, N^o. L 174, 8 de Julio de 2010, pp. 18–39.

[27] Adaptado de la página web de la EU. Junio 2013

http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=9538777&CFTOKEN=66609657&jsessionid=0804da912c60167f497cTR

Además, como consecuencia de esta legislación podemos decir que en la UE no pueden autorizarse sustancias activas de productos fitosanitarios a menos que se haya probado científicamente que:

- No producen efectos perjudiciales en los consumidores, los agricultores ni a terceros.
- No provocan efectos inaceptables en el medio ambiente.
- Son suficientemente eficaces.

2.4 Electroforesis capilar

Las separaciones mediante CE se basan en las diferencias entre las movilidades electroforéticas de los distintos analitos, como consecuencia de su diferente relación carga/tamaño, dentro de un tubo capilar lleno de disolución tampón cuando se somete a la acción de un campo eléctrico. Para llevar a cabo la separación son necesarios los siguientes elementos (Figura 4):

- **Fuente de alto voltaje:** capaz de aplicar hasta 30 kV.
- **Capilar:** generalmente son de sílice fundida y su diámetro interno oscila entre 25 y 100 μm y el externo es de 375 μm .
- **Detector:** el más utilizado es el UV/Vis aunque también se pueden utilizar detectores de fluorescencia (FL), espectrometría de masas (MS), y menos frecuentemente, detectores de quimioluminiscencia (CL), fosforescentes y espectrometría Raman.
- **Viales:** además del vial de muestra son necesarios un vial con agua, otro con hidróxido sódico y otro con disolución tampón para acondicionar el capilar, un vial de desecho y dos más con tampón electroforético para cerrar el circuito cuando apliquemos el voltaje.
- **Sistema de introducción de la muestra:** el modo más habitual es aplicando presión sobre el vial de muestra (inyección hidrodinámica) aunque también se puede hacer mediante la aplicación de voltaje (inyección electrocinética). Otra posibilidad es

elevando el vial de entrada para que la muestra entre por gravedad (inyección por efecto sifón).

- **Sistema de termostatación del capilar:** con este sistema se consigue evitar el aumento de la temperatura por efecto Joule, manteniéndola constante durante todo el análisis.

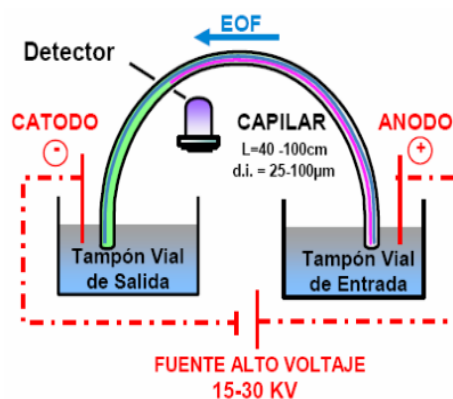


Figura 4. Sistema de electroforesis capilar

En las separaciones electroforéticas se dan dos fenómenos simultáneamente: la electroósmosis y la electromigración que dan lugar a dos flujos, el llamado flujo electroforético y el flujo electroosmótico (*electroosmotic flow*, EOF). El primero se produce por movimiento de los iones por acción del campo eléctrico aplicado y sólo afecta a las especies cargadas en disolución también que contrarrestan la carga negativa de los grupos silanoles que constituyen las paredes internas del capilar de sílice por aparición de una doble capa eléctrica. En CE, además de las moléculas de soluto cargadas, la disolución tampón también se desplaza por el capilar bajo la influencia del campo eléctrico, provocando la aparición del EOF, como consecuencia de que la superficie interna del capilar está cargada. Así, los cationes arrastran moléculas de disolvente en su movimiento hacia el cátodo lo que origina un flujo de disolvente en ese sentido, que aumenta cuanto mayor es el pH del tampón. El movimiento global de las especies en el medio electroforético en función de su relación carga/radio se representa en la figura 5.

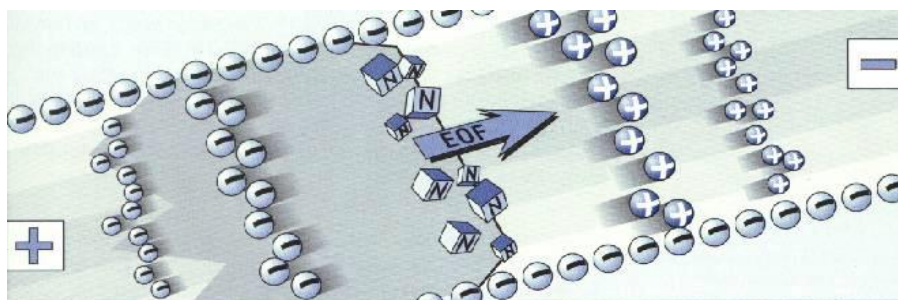


Figura 5. Migración diferencial de las moléculas según su carga/radio

El gran interés de la CE se debe, indudablemente, a la alta eficacia que presenta, con un mínimo consumo de disolventes y de muestras pero sobre todo, a la gran versatilidad en términos de modos de separación, los cuales, basándose en diferentes principios físico-químicos, dan lugar a una amplia gama de selectividad en las determinaciones:

- **Electroforesis capilar zonal (CZE):** es la modalidad más empleada por ser la más sencilla. Consiste en rellenar todo el capilar con un electrolito de fondo que en la mayoría de los casos es un tampón.
- **Electroforesis capilar en gel (CGE):** el capilar se rellena con un gel. La separación se basa en las diferencias de tamaños entre las moléculas puesto que el gel actúa de criba.
- **Electrocromatografía capilar (CEC):** el capilar se rellena de fase estacionaria y los analitos se separan en base al equilibrio de partición entre la fase estacionaria y la fase móvil.
- **Isoelectroenfoque capilar (CIEF):** consiste en establecer un gradiente de pH a lo largo del capilar. Se ha empleado para separar proteínas y péptidos basándose en sus diferentes puntos isoeléctricos.
- **Isotacoforesis capilar (CITP):** es similar a CZE con la diferencia de que ahora el electrolito no es continuo, sino que el tampón de entrada no es el mismo que el de salida. Su limitación es que no podemos separar cationes y aniones a la vez.

- **Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC):** el uso de disoluciones micelares de surfactantes iónicos a concentraciones superiores a la concentración micelar crítica, permite la separación de moléculas tanto cargadas como neutras. Al ser esta modalidad la empleada en esta tesis de máster se comentará más extensamente en un apartado posterior.

2.4.1 Electroforesis capilar con detección UV-Vis

Este es el modo de detección más comúnmente empleado en CE y que presentan la mayoría de los equipos comerciales. La utilización de un detector de diodos en fila (DAD) en lugar de la detección por única o múltiple longitud de onda supone muchas ventajas, como son: visualización del espectro UV-Vis en todo momento del análisis, obtención del electroferograma a cualquier longitud de onda en una sola inyección, determinación del máximo de absorbancia para todos los analitos, identificación de compuestos y determinación de la pureza de pico.

Sin embargo, el principal inconveniente que presenta la aplicación de la CE-UV-Vis en la determinación de residuos de contaminantes radica en la necesidad de una elevada sensibilidad, lo cual contrasta con la limitación de esta técnica, debido a los bajos volúmenes de inyección introducidos y a la baja sensibilidad obtenida al usar el capilar como celda de detección. Para solventar este inconveniente se han propuesto distintas aproximaciones para aumentar la sensibilidad, siendo las más comunes:

- Uso de tratamientos para preconcentrar la muestra.
- Mejora del camino óptico.
- Técnicas de preconcentración *on-line*.

La primera de ellas supone el desarrollo de métodos de extracción y limpieza que permitan aumentar la concentración de analito en el extracto final. Estos métodos se comentarán en un apartado posterior.

En cuanto a la segunda aproximación, la dependencia de la absorbancia con el camino óptico, según la ley de Lambert-Beer, hace que la sensibilidad esté limitada como consecuencia del pequeño camino óptico que el capilar ofrece.

Esto hace que el detector tenga que ser cuidadosamente diseñado para enfocar la máxima luz en el capilar y minimizar la luz dispersa que llega al monocromador.

Existen varias alternativas que permiten mejorar la sensibilidad mediante el aumento del camino óptico, según se muestra en la Figura 6.

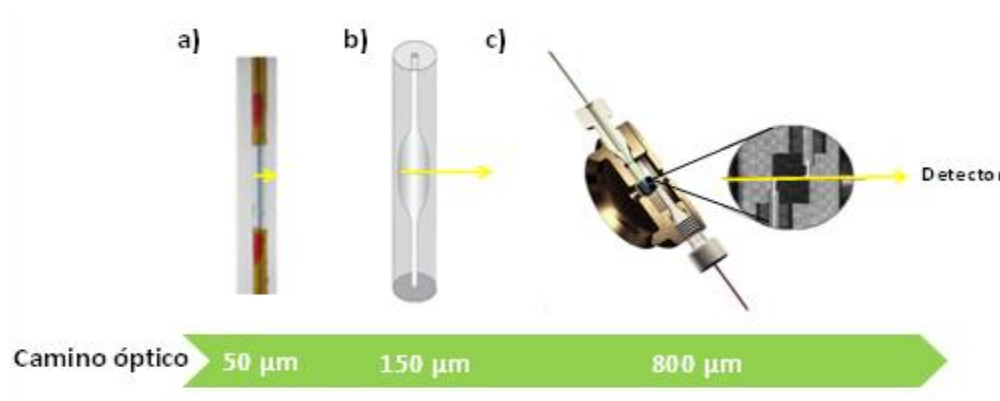


Figura 6. (a) Ventana de detección típica en CE; (b) capilar burbuja; (c) celda de flujo de alta detección

Una de las opciones es el uso de capilares con camino óptico extendido, denominados capilares burbuja, en los que el diámetro interno está aumentado de 3 a 5 veces en el punto de detección, sin que esto implique un aumento en la difusión del analito. En los capilares burbuja se crea una región expandida en el interior del capilar, de manera que es el diámetro interno el que se modifica localmente pero no el externo. Dado que la burbuja se localiza solamente en la región de detección, no se produce incremento alguno de la corriente. Sin embargo, en dicha zona se produce una disminución local de la velocidad de flujo y de la resistencia eléctrica y, por tanto, del campo eléctrico, disminuyendo así la velocidad de migración de los analitos.

Otra opción es la utilizando de una celda de flujo de alta detección en la que la iluminación es axial en lugar de perpendicular. En este tipo de celdas lo que se hace es cambiar el sentido de la radiación sobre el capilar, deformándolo en la región de detección formando una zeta y haciendo incidir la luz longitudinalmente; en este caso, el volumen interno del capilar no se modifica.

El uso de capilares burbuja está bastante extendido ya que para su empleo, no se precisa ningún cambio en las condiciones electroforéticas (siempre y cuando la resolución entre los analitos sea aceptable). Por el contrario el uso de celdas de flujo de alta detección no se ha generalizado, dado que su manejo a veces no es sencillo (ya que consiste en una unión entre varios capilares que requiere que el operador tenga bastante experiencia para conseguir que la corriente sea estable) y, aunque el incremento de sensibilidad obtenido es apreciable, la resolución y la eficacia de los picos pueden verse afectadas de manera importante.

La tercera alternativa para aumentar la sensibilidad está basada en el empleo de una serie de técnicas de introducción de muestra que proporcionan un efecto de concentración en el propio capilar, permitiendo el uso de mayores volúmenes y mejorando la relación señal/ruido. Dentro de estas técnicas, se han empleado el “apilamiento” o *stacking* y el Sweeping las cuales más tarde se comentarán.

2.4.2 Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Como ya se ha comentado, el empleo de medios micelares en electroforesis capilar incrementa el potencial de dicha técnica de separación, ya que permite la separación tanto de compuestos cargados como neutros. Consiste en añadir un surfactante al tampón electroforético en una concentración superior a la concentración micelar crítica (CMC), de manera que los compuestos neutros se distribuyen en un equilibrio entre dentro y fuera de las micelas formadas. Estas micelas, de forma esférica, tienen la parte hidrofílica de las moléculas de surfactante orientadas hacia la solución tampón, mientras que la parte hidrofóbica está orientada hacia el interior. Las moléculas neutras interactúan con la micela en diferente grado en función de su hidrofobicidad, dando lugar a la separación (Figura 7). La micela actúa, de este modo, como fase pseudoestacionaria, ya que realiza una función similar a la de una fase estacionaria en cromatografía. Los surfactantes más utilizados en MEKC son los aniónicos (como el dodecilsulfato sódico, SDS) y a pesar de su carga negativa, la micela o el conjunto micela-analito neutro migran hacia el cátodo arrastrados por el EOF.

[28] H.Y. Xie, Y.Z. He, W.E. Gan, G.N. Fu, L. Li, F. Han, Y. Gao, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3353.

También han sido empleados surfactantes catiónicos, como el bromuro de deciltrimetilamonio (DTAB), no iónicos (Tritón X-100), zwitteriónicos, como el 3-[(3-sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) o sales biliares (ácido taurocólico). Si los solutos no son neutros, hay que tener en cuenta otros efectos: relación carga/masa, hidrofobicidad e interacción de carga. El uso de otros aditivos (metanol, ciclodextrinas, iones metálicos, etc.), además de las micelas, permite obtener mejoras en la selectividad y resolución.

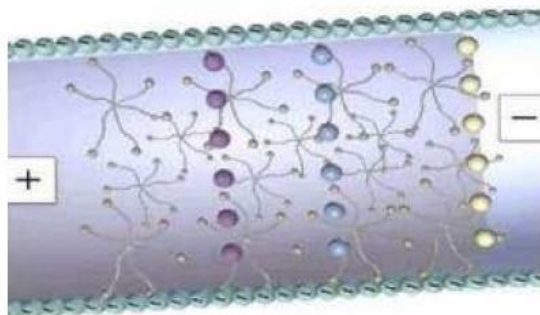


Figura 7. Esquema de separación en MEKC

En esta memoria de máster se propone por primera vez el empleo de un líquido iónico en el tampón electroforético como medio organizado. Hasta la fecha, su empleo en electroforesis capilar se ha limitado a su adición al medio electroforético, únicamente como modificadores del mismo, para mejorar la resolución entre picos además de la separación de mezclas quirales, siempre en la modalidad de electroforesis capilar zonal [29,30].

[29] C.M. Graham, J.L. Anderson, *Ionic Liquids UnCOILed* (2013) 87.

[30] P. Sun, D.W. Armstrong, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 1.

2.5 LÍQUIDOS IÓNICOS: DESCRIPCIÓN Y APLICACIONES.

Los líquidos iónicos (ILs) son sales fundidas a temperatura ambiente, cuyo punto de fusión es inferior a 30°C. La gran originalidad de los ILs reside en que no están formados por moléculas, sino únicamente por iones, lo que les proporciona importantes propiedades como disolventes y su aspecto es semejante al de un líquido clásico ligeramente viscoso.

Los ILs son conocidos y utilizados desde hace décadas. Sin embargo, las sales fundidas sólo existen a elevadas o muy elevadas temperaturas. Por ejemplo, los puntos de fusión a los cuales los cloruros de sodio, potasio, aluminio o calcio se hallan como líquidos iónicos son 801, 770, 190 y 782 °C, respectivamente. La mayoría de las moléculas orgánicas se descomponen a estas temperaturas tan elevadas. El hecho de disponer de sales fundidas a temperatura ambiente ha originado una nueva clase de disolventes para la química.

El primer líquido iónico fue descubierto fortuitamente en 1914 durante la primera guerra mundial, mientras se buscaban nuevos explosivos. Se trata del nitrato de etilamonio cuyo punto de fusión es de 12°C [31]. A partir de los años ochenta, Seddon y su equipo empezaron a utilizar los ILs como disolventes polares no acuosos. Realizaron estudios originales con complejos de metales de transición en electroquímica y espectroscopia [32,33,34].

De forma general, se puede decir que los ILs están formados por un catión orgánico que contiene un heteroátomo de nitrógeno o fósforo asociado a un anión orgánico o mineral de gran tamaño [31]. Los cationes voluminosos N-alquil piridinio y N-alquil-3 metil imidazolio, pueden combinarse con aniones inorgánicos tales como Cl, la asociación $\text{Cl}^-/\text{AlCl}_3$, NO_3^- , PF_6^- o BF_4^- . Dos aniones de gran tamaño, bis-(trifluorometilsulfonil) amiduro $((\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-)$ y trifluorometil sulfonato $(\text{CF}_3\text{SO}_3^-)$, forman líquidos iónicos con numerosos cationes orgánicos. Las posibles combinaciones de estos cationes y aniones pueden originar un gran número de ILs, proporcionando así una flexibilidad considerable en la selección del mejor IL para una aplicación química específica.

[31] P Wasselcheid, W Keim, *Angew. Chem Int. Ed.* 39 (2000) 3772.

[32] D Appleby, C Hussey, K R Seddon, *LE, Imp, Nature* 323 (1986) 614.

[33] K R Seddon, *Kinet Cata.* 37 (1996) 693.

[34] N J Earle, K R Seddon, *Pure Appl Chem* 111. 72 (2000) 1391.

En la figura 8 se recogen los aniones y cationes más comúnmente empleados en los IL.

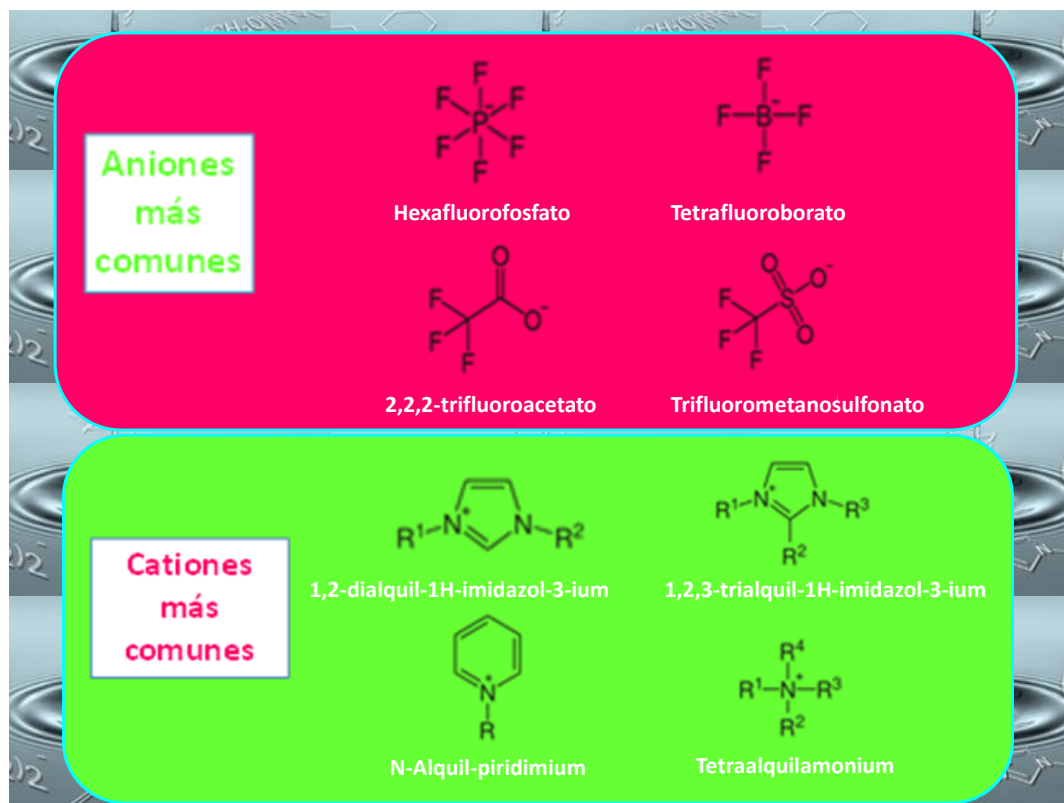


Figura 8. Estructura de los aniones y cationes más empleados en los líquidos iónicos.

Las principales propiedades de los ILs son:

- Bajo punto de fusión (son líquidos a temperatura ambiente)
- Presión de vapor muy baja (no son volátiles)
- No inflamables y no corrosivos
- Potencialmente solubles en agua
- Buenas propiedades técnicas: estabilidad térmica, propiedades electroquímicas, viscosidad, densidad y pH variable.
- Capaces de disolver tanto moléculas apolares como aquellas que son muy polares.

Se han descrito múltiples aplicaciones de los ILs en campos diversos como fisicoquímica, bioprocesos, ingeniería, etc., algunas de las cuales se recogen en la figura 9.



Figura 9. Usos y aplicaciones de los líquidos iónicos

El IL seleccionado en esta memoria como constituyente del medio electroforético en MEKC está basado en un anillo de imidazolium, el tetrafluoroborato de -dodecil-3-methylimidazolium cuya estructura se recoge en la figura 10.

Las micelas formadas en la zona próxima al anillo imidazolium, pueden ofrecer un modo de separación alternativo con respecto a los surfactantes más comúnmente utilizados en MEKC para el análisis de CBRs.

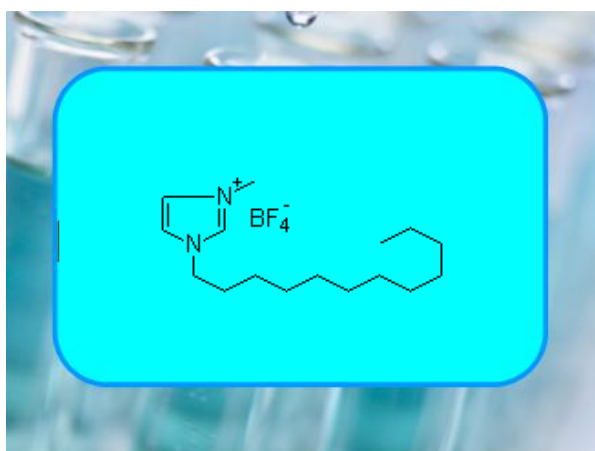


Figura 10. Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolium

2.6 TRATAMIENTOS DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBAMATOS

Dentro del proceso analítico una de las etapas más importantes es el tratamiento de muestra, ya que existen multitud de compuestos que pueden interferir en la medida analítica, siendo muy pocas las muestras que actualmente pueden ser analizadas directamente.

La etapa de tratamiento de la muestra tiene dos objetivos fundamentales:

- La extracción del analito de la propia matriz de la muestra para que pueda ser cuantificado con fiabilidad.
- La preconcentración del analito, si éste se encuentra a concentraciones muy bajas.

Entre las principales técnicas de tratamiento de muestra empleadas actualmente en la determinación de CRBs, destacan la extracción líquido-líquido (LLE) [35] y la extracción en fase sólida (SPE) [36], aunque en los últimos años se han producido importantes avances en el desarrollo de técnicas de extracción, dirigidos principalmente al desarrollo de métodos más rápidos, más respetuosos con el medio ambiente y con los que se consiga una mayor preconcentración [37,38].

2.6.1 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)

En los últimos años existe un creciente interés en la simplificación y miniaturización de los sistemas de tratamiento de muestra, introduciendo disolventes menos contaminantes y disminuyendo considerablemente las cantidades de disolventes orgánicos utilizados, en consonancia con los principios de la llamada Química Verde [39], o Química beneficiosa para el medio ambiente, que se ocupa del diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y producción de sustancias peligrosas, implicando una mayor seguridad y un menor coste en relación a los procesos convencionales.

[35] S.M. Goulart, R.D. Alves, A.A. Neves, J.H. de Queiroz, T.C. de Assis, M.E.L.R. de Queiroz, *Anal. Chim. Acta* 671 (2010) 41.

[36] L.M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2557.

[37] L. Ramos, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84.

[38] L. Zhang, S. Liu, X. Cui, C. Pan, A. Zhang, F. Chen, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 900.

[39] A.S. Matlack, "Introduction to Green Chemistry", 2 Ed., Marcel Dekker (2010).

La microextracción en fase líquida (LLME) es una técnica simple y económica en la que se requieren sólo unos microlitros de disolvente para extraer y concentrar a los analitos a partir de las muestras, en lugar de los elevados volúmenes requeridos en la LLE convencional. Además, es compatible con GC, HPLC y CE. En LLME la extracción normalmente tiene lugar en una pequeña cantidad de disolvente inmisible con el agua (fase aceptora) a partir de una muestra acuosa que contiene los analitos (fase donora). Dentro de este tipo de extracción, podemos distinguir las siguientes modalidades:

- Microextracción de gota simple (*single drop microextraction*, SDME)
- Microextracción de fibra hueca (*hollow-fiber microextraction*, HF-LLME)
- Microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME)

En esta memoria se ha empleado la DLLME, introducida por Rezaee y col. en 2006 [40]; hasta la fecha este artículo ha sido referenciado en más de 700 ocasiones [41] lo que pone de manifiesto el impacto que ha tenido en el campo de la Química Analítica. Esta técnica ha sido ampliamente empleada debido a su simplicidad de operación, rapidez, bajo coste, altas recuperaciones, elevados factores de enriquecimiento y alta compatibilidad con el medio ambiente, debido al reducido volumen de disolventes orgánicos requerido. Sus aplicaciones han sido recogidas en diversos artículos de revisión [42-45].

La DLLME está basada en la rápida inyección de una mezcla, en proporciones adecuadas, de unos pocos microlitros de disolvente extractante y un disolvente dispersante en el seno de una muestra acuosa que contiene los analitos de interés. Esta rápida inyección produce una gran turbulencia, originándose la formación de finas gotas de extractante que se dispersan a través de la muestra acuosa.

[40] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.

[41] Adaptado de la página web del Scopus. Junio 2013
<http://www.scopus.com/>

[42] X.H. Zang, Q.H. Wu, M.Y. Zhang, G.H. Xi, Z. Wang, *Chin. J. Anal. Chem.* 37 (2009) 161.

[43] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342.

[44] A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 728.

[45] A. Zgoła-Grzeskowiak, T. Grzeskowiak, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1382.

Tras centrifugación, se obtiene la separación de las fases acuosa y orgánica, siendo posible el análisis de esta última fase para la determinación de los analitos de interés. Un esquema general de la DLLME se muestra en la Figura 11.

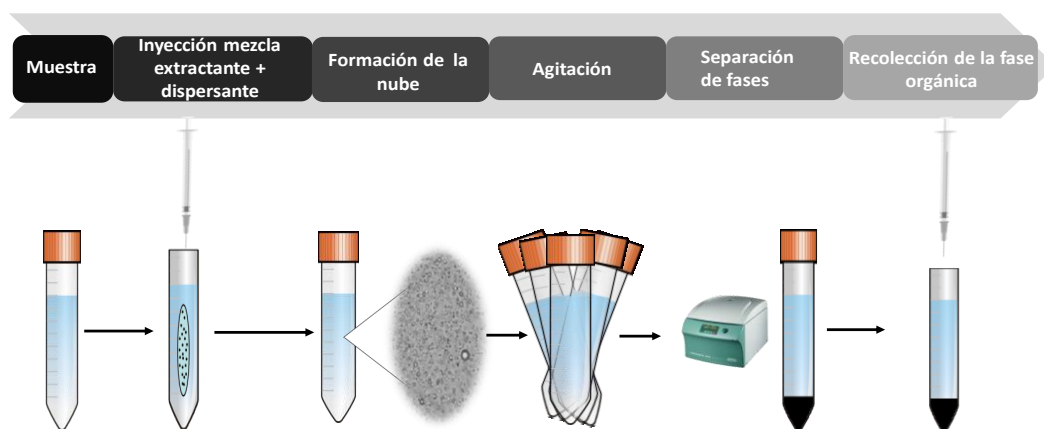


Figura 11. Esquema del procedimiento de DLLME

La DLLME ha sido empleada para la determinación de CRBs mayoritariamente en muestras medioambientales [46-50], pero también se encuentran aplicaciones en alimentos, como melón y tomate [51], manzana [52] o zumos [53].

[46] K. Farhadi, M.A. Farajzdeh, A.A. Matin, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2442.

[47] L. Fu, X. Liu, J. Hu, X. Zhao, H. Wang, C. Huang, X. Wang, *Chromatographia* 70 (2009) 1697.

[48] H. Lijun, W. Chunjian, S. Yinjuan, X. Luo, J. Zhang, K. Lu, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 89 (2009) 439.

[49] Z.M. Liu, X.H. Zang, W.H. Liu, C. Wang, Z. Wang, *Chin. Chem. Lett.* 20 (2009) 213.

[50] H. Chen, R. Chen, S. Li, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1244.

[51] Z. Liu, W. Liu, H. Rao, T. Zeng, C. Li, C. Wang, Z. Wang, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92 (2012) 571.

[52] S. Zhang, C. Li, S. Song, T. Feng, C. Wang, Z. Wang, *Anal. Methods* 400 (2010) 54.

[53] L. Fu, X. Liu, J. Hu, X. Zhao, H. Wang, X. Wang, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 289.

3. Experimental



3.1 Reactivos, disoluciones, material y muestras

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico y los disolventes de grado HPLC. El agua empleada en todo el trabajo fue agua ultrapura ($18.2 \text{ m}\Omega\text{cm}^{-1}$) obtenida mediante el sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU). El hidróxido de sodio y cloruro de hidrógeno se adquirieron en Panreac-Química (Madrid, España); ácido clorhídrico de Scharlab (Barcelona, España), acetonitrilo (ACN), acetona (ACO), metanol (MeOH), etanol (EtOH), isobutanol (ISOB) e isopropanol (IPA) se obtuvieron de Merck; cloroformo (CHCl_3), diclorometano (CH_2Cl_2), tetracloruro de carbono (Cl_4C) y dibromometano (CH_2Br_2) de VWR (WestChester, PA, EE.UU.),

Los patrones analíticos de CF, MTL, FEN, ALD, ALDSFX, TH, ETH, ISP y ASL fueron suministrados por ChemService Inc (West Chester, USA), mientras que BY, PRC, BF, PX, NP y CBZ por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Cada disolución patrón individual contenía 3.0 g L^{-1} de plaguicida y se prepararon pesando las cantidades adecuadas y disolviéndolas en MeOH. Dichas disoluciones se almacenaron en la oscuridad a 4°C , siendo estables durante al menos 4 meses. Las disoluciones intermedias conteniendo todos los CRBs se prepararon cada dos semanas por dilución adecuada de las disoluciones patrón con MeOH.

Los IL que se utilizaron fueron tetrayoduro de 1-dodecil-3-metilimidazolium (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EEUU), hexafluorofosfato de 1-dodecil-3-metilimidazolium, clorhídrico 1-decil-3-metilimidazolium y tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolium, suministrados por IoLiTec Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, Alemania)

Filtros de jeringa de nylon de $0,2 \mu\text{m}$ marca Acrodisc (Pall Corp., MI, EE.UU.) utilizados para la filtración de los extractos de la muestra, antes de la inyección en el equipo de electroforesis.

En el tratamiento de muestra se utilizaron tubos Falcon de 15 y 45 mL (VWR International West Chester, PA, USA) y jeringas de 1 y 2 mL (BD Discardit, USA).

Las muestras de zumo de tomate, zumo de uva blanca y zumo de uva roja fueron adquiridas en un establecimiento comercial en Granada.

3.2 Instrumentación y software

Las medidas electroforéticas se llevaron a cabo con un equipo HP^{3D} (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania) equipado con un detector de diodos en fila (figura 12), operando a una longitud de onda de 200 nm. Las separaciones se llevaron a cabo primero en un capilar normal de sílice fundida, durante el estudio de las variables que afectan a la separación y, seguidamente en un capilar del mismo material con celda de detección tipo burbuja con un camino óptico de 200 μm , durante la optimización del tratamiento de muestra y caracterización del método propuesto. Ambos capilares tenían una longitud total de 64,5 cm (longitud efectiva de 56 cm) y un diámetro interno de 75 μm , comercializados por Agilent Technologies.

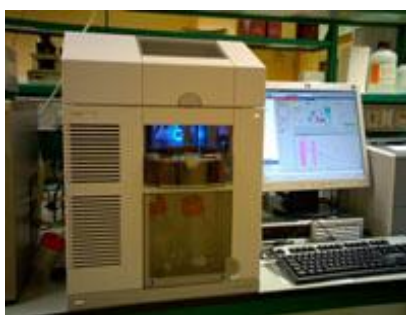


Figura 12. Equipo de CE acoplado a un detector UV-Vis

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España).

Para la extracción de las disoluciones patrón y muestras se utilizó un agitador Vórtex-2 Genie (Scientific Industries, Bohemia, NY, EEUU), una centrífuga Model Universal 320R (Hettiche, Tuttlingen, Alemania) y un sistema de evaporación de nitrógeno Evaporators EVA EC-S/EVA LS-S (VLM GmbH, Bielefeld, Alemania).

También se utilizó un baño de ultrasonidos para la preparación de las diferentes disoluciones (USS-300 MODEL; VWR, West Chester, PA, EEUU).

Los electroferogramas obtenidos se registraron y procesaron con el programa ChemStation, versión B.02.01. Asimismo, se utilizaron los programas Excel (Microsoft), versión 2007 y StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, EEUU) para el posterior tratamiento de datos

3.3 Procedimiento electroforético propuesto

La separación de los plaguicidas se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida aplicando un voltaje de -22,5 kV (modo negativo) y manteniendo el capilar a una temperatura de 25°C. La inyección de la muestra se realizó en modo hidrodinámico aplicando 50 mbar durante 7,5 s.

En cuanto al empleo y conservación del capilar de separación, antes de ser utilizados por primera vez, los capilares nuevos se acondicionaron con una disolución de NaOH 1 M durante 10 min, seguido de agua Milli-Q durante otros 10 min y finalmente con tampón electroforético 10 min. Al principio de cada sesión de trabajo, el capilar se acondicionaba haciendo pasar agua Milli-Q durante 3 min, seguida de una disolución de NaOH 0,1 M durante 7 min, a continuación agua Milli-Q durante 1 min y, finalmente, tampón electroforético durante 5 min. Después de cada análisis, el capilar se acondicionaba durante 2 min con NaOH 0,1 M, 1 min con agua Milli-Q y 2 min con tampón electroforético para mantener una adecuada repetitividad entre análisis. Con objeto de evitar el deterioro de las paredes del capilar por efecto del tampón así como la formación de depósitos de sales, al final de cada sesión se lavaba con agua, durante 5 minutos a 5 bares de presión y, posteriormente, se pasaba una corriente de aire en las mismas condiciones que la corriente de agua.

3.4 Procedimiento de tratamiento de muestra mediante DLLME

Como tratamiento de muestra, previo a la separación electroforética, se empleó la microextracción líquido líquido dispersiva (DLLME) con objeto de preconcentrar los analitos y limpiar la muestra.

A continuación se describe el tratamiento de muestra propuesto, recogido asimismo en la Figura 13:

- Se toman 50 mL de zumo (tomate, uva roja y uva blanca) y se centrifugan a 9000 rpm durante 10 min, para separar las partículas sólidas presentes en el mismo
- Se pipetea 5 mL del zumo centrifugado y se transfieren a un tubo Falcon de 15 mL.
- Se inyecta rápidamente la mezcla del disolvente de extracción (870 μ L de cloroformo) y del disolvente de dispersión (1500 μ L metanol)
- Se agita vigorosamente durante 1 min.
- Se centrifuga a 3000 rpm durante 2 min
- Una vez que se ha producido la separación de fases, se extrae con ayuda de una jeringa la fase más densa, que contiene los CRBs y se transfiere a un vial de vidrio.
- Se seca con corriente de nitrógeno
- Se recompone en 0,25 mL de tampón electroforético a pH 9
- Se filtra con filtro de 0,2 μ m
- Finalmente se analiza mediante MEKC con detección UV-Vis

En este caso, con el tratamiento DLLME descrito, el factor de preconcentración es de 20 veces.

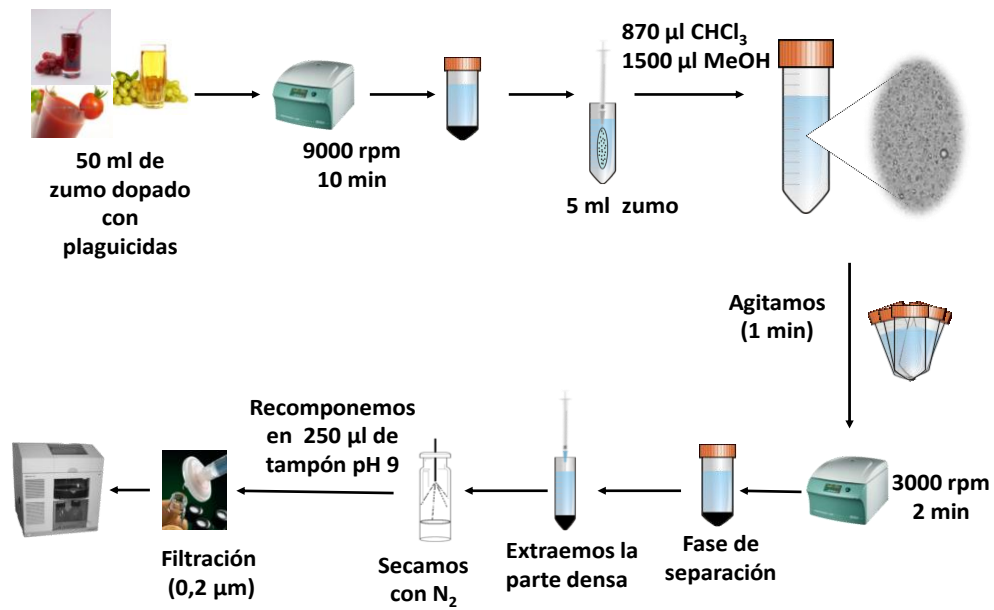


Figura 13. Esquema del tratamiento de muestra para la determinación de CRBs en zumo mediante el método propuesto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Optimización de la separación electroforética

En primer lugar se optimizaron todas las variables que influyen en el sistema electroforético: pH, naturaleza y concentración del tampón, voltaje, temperatura y tamaño del capilar. El criterio utilizado para seleccionar los valores óptimos, fue la resolución entre los diferentes picos así como el área de pico electroforético. El estudio se realizó empleando inicialmente un capilar de 75 μm de d.i. y de longitud total 64.5 cm (longitud efectiva = 56 cm). En todos los casos se impuso como restricción que el valor de la intensidad no superara los 150 μA con objetivo de evitar la ruptura del capilar de separación por efecto joule.

Los 15 analitos objeto de estudio fueron: ALD, ASL, ALDSFX, BY, BF, CBZ, CF, ETH, FEN, ISP, MTL, NP, PRC, PX y TH, a una concentración inicial de 5 mg L^{-1} .

4.1.1 Optimización del pH y naturaleza del tampón

El primer paso en la optimización del sistema electroforético fue determinar el pH más adecuado para la separación. Al consultar la bibliografía existente sobre el análisis de CRBs mediante MEKC, el pH empleado mayoritariamente se situaba en la zona básica [56,54,55]. Por tanto, para nuestro estudio se consideró inicialmente el rango de 4.5 a 10.

Los valores de pka de los diferentes CRBs en estudio, recogidos en la introducción, nos indican que a pH básicos la mayoría de ellos se encuentran en estado neutro y por ello presentan una buena interacción con las micelas [56].

El electrolito de separación consistía en una disolución de tampón fosfato 30 mM, más el líquido iónico (tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metillimidazolium) como medio micelar a una concentración 20 mM. La muestra se disolvía en el electrolito de fondo (BGE) y se inyectaba en modo hidrodinámico aplicando una presión de 35 mbar durante 5 s. El voltaje empleado era de -25 kV, y la temperatura del capilar 25 °C.

[54] E. Rodríguez- Gonzalo, L.Ruano. Miquel, R. Carabias Martínez, *Electrophoresis*.30 (2009) 1913.

[55] D. Moreno-González, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, J.M. Bosque-Sendra, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 1329.

[56] M. Molina, S. K. Wiedmer, M. Jussila, M. Silva, M. L. Riekkola, *J. Chromatograph. A.* 927 (2001) 191.

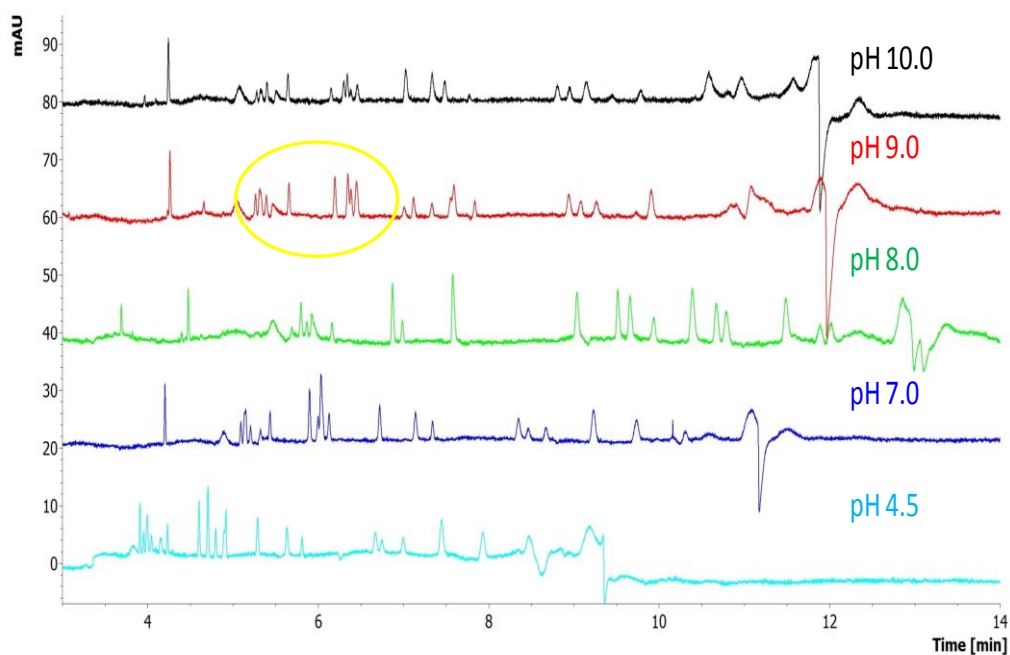


Figura 14. Optimización del pH

Como resultado del estudio se observó que a valores de pH superiores a 8 aumentaba la resolución del grupo de picos con tiempos de retención en torno a 6 min (figura 14), además de mejorar la relación S/N para la mayoría de los analitos, por lo que se seleccionó como óptimo el pH 9.0 en una primera aproximación.

Una vez seleccionado el valor de pH 9.0, se procedió a optimizar la naturaleza del tampón. Para ello se ensayaron diferentes naturalezas considerando aquellos cuya máxima capacidad amortiguadora se situara próxima a dicho valor de pH.

Las disoluciones tampón elegidas fueron: fosfato/NaOH, bórico/NaOH, tris/HCl, bicarbonato/NaOH, carbonato/HCl y tetraborato/HCl. La concentración que se empleó para cada una de ellas fue 30 mM a pH 9.0 más el IL (tetrafluoroborato de 1-dodecil-3 metilimidazolium) a una concentración de 20 mM.

La muestra se disolvía en el BGE y se inyectaba en modo hidrodinámico aplicando una presión de 35 mbar durante 5 s. El voltaje empleado era de -25 kV, y la temperatura del capilar 25 °C.

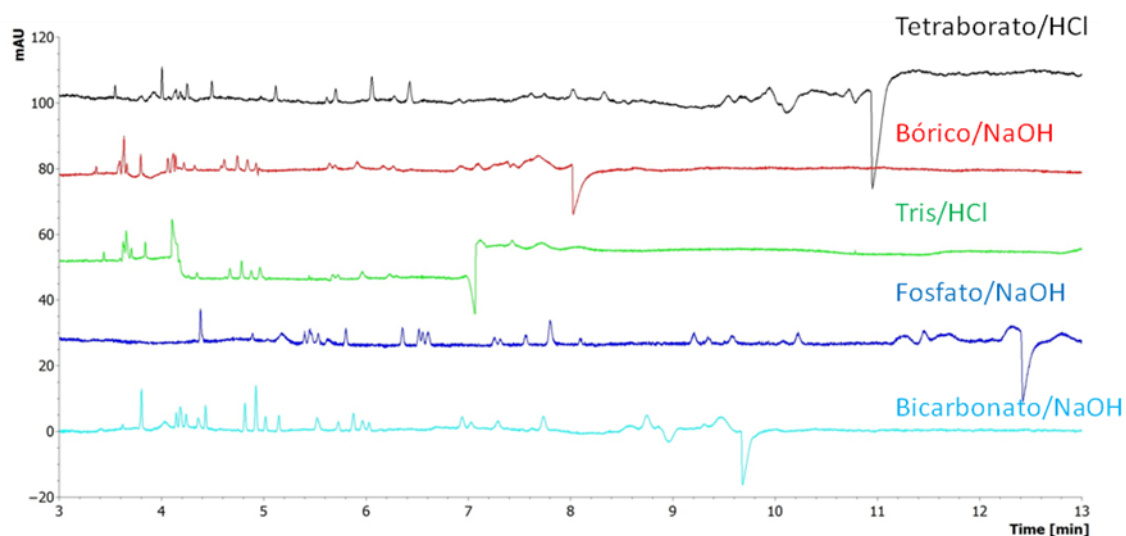


Figura 15. Optimización de la naturaleza del tampón

A partir de los resultados, podemos concluir, que el bicarbonato es el tampón electroforético más apropiado para nuestro estudio, ya que nos proporciona mejores resultados en cuanto a la resolución entre picos, mejor relación S/N y un tiempo de análisis relativamente corto.

Una vez seleccionado el valor de pH aproximado y la naturaleza del tampón se realizó un estudio más exhaustivo del pH en el rango 8.6-9.4 a intervalos de 0.2 unidades.

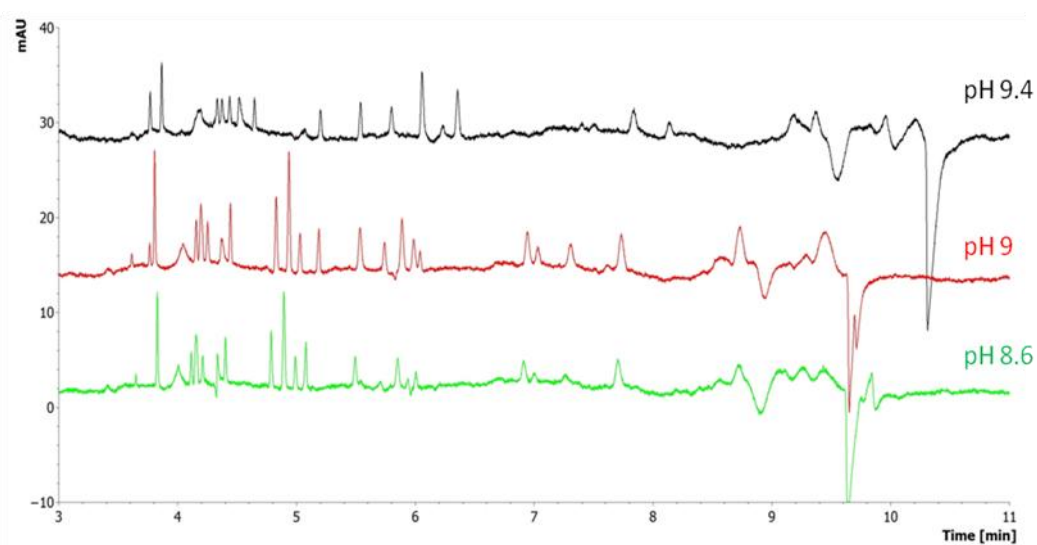


Figura 16. Optimización exhaustiva del pH

A partir de los electroferogramas recogidos en la figura 16, y que para mayor claridad se han reducido a tres, se puede observar que para valores de pH superiores a 9,0 aumenta el tiempo de análisis y disminuye la intensidad de los picos, además a pHs inferiores a 9,0 no se produce una mejora en la separación. Por lo que fue seleccionado el pH 9.0 como óptimo para todos los estudios posteriores.

4.1.2 OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN

La concentración de la disolución tampón de bicarbonato a pH 9.0 fue la siguiente variable a estudiar. El rango de concentraciones en el que se realizó el estudio fue el comprendido entre 25-45 mM.

La muestra disuelta en el BGE fue inyectada en modo hidrodinámico aplicando una presión de 35 mbar durante 5 s. El voltaje empleado era de -25 kV, y la temperatura del capilar 25 °C.

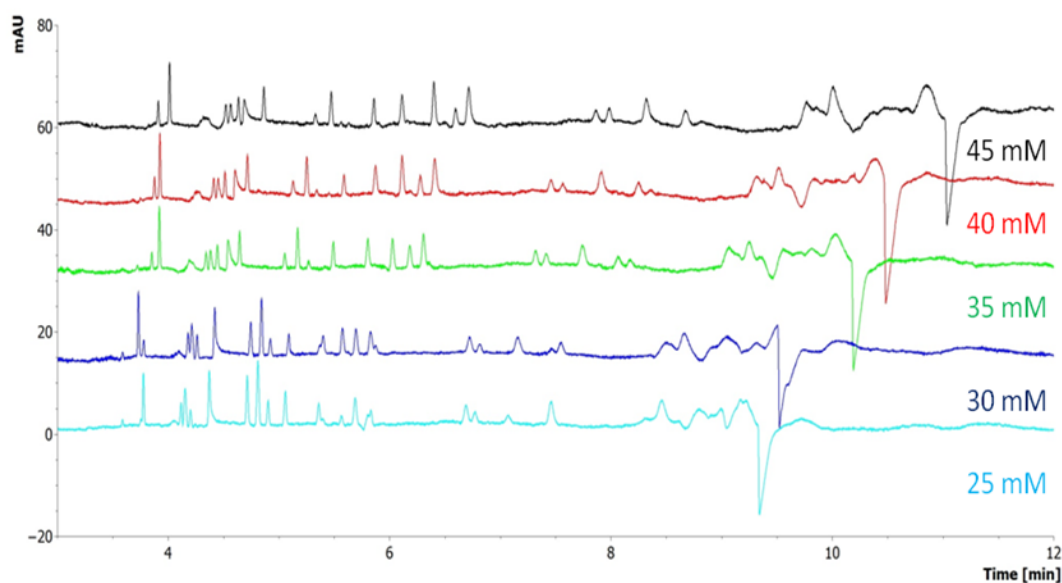


Figura 17. Optimización de la concentración de tampón

Como puede observarse en la figura 17, a medida que aumenta la concentración de la disolución reguladora, el tiempo de análisis aumenta, pudiéndose separar un mayor número de analitos.

Finalmente concluimos que la concentración de bicarbonato óptima era de 35 mM, ya que proporcionaba un compromiso entre resolución de picos y tiempo de análisis, con una corriente de -30 μ A.

4.1.3 Optimización de la naturaleza y concentración del líquido iónico (medio organizado)

Una vez definida la naturaleza, concentración y pH del medio electroforético, se seleccionó el IL más adecuado de entre los que había disponibles en el laboratorio. Se probaron cuatro de ellos: tetrayoduro de 1-dodecil-3-metilimidazolium, hexafluorofosfato de 1-dodecil-3-metilimidazolium, clorhídrico 1-Decil-3-metilimidazolium y tetrafluoroborato 1-dodecil-3-metilimidazolium. Finalmente se seleccionó el tetrafluoroborato 1-dodecil-3-metilimidazolium como medio micelar ya que con el resto de IL la conductividad del medio era muy elevada (corrientes superiores a 150 μ A) por lo que los capilares sufrían ruptura por efecto Joule, por ello no pudimos recoger ningún electrofereograma de estas experiencias.

Para optimizar la concentración de IL en el medio electroforético se llevó a cabo el estudio con una disolución tampón que no contenía líquido iónico, y tampones que contenían concentraciones crecientes entre 15 y 30 mM, todas ellas por encima de la concentración micelar crítica ($cmc=10$ mM).

La muestra disuelta en el BGE fue inyectada de modo hidrodinámico aplicando una presión de 35 mbar durante 5 s. El voltaje empleado era de -25 kV, y la temperatura del capilar 25 °C.

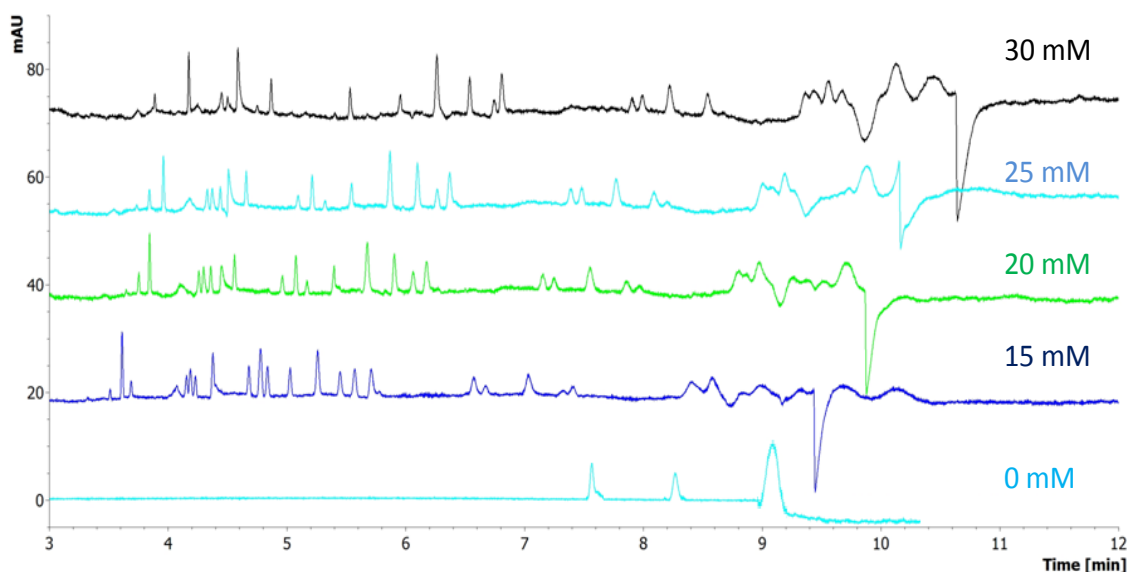


Figura 18. Optimización de la concentración de IL

A partir de los electroferogramas recogidos en la figura 18 podemos concluir que es necesaria la presencia del IL para abordar el análisis de nuestros analitos. Como se puede observar, en el electroferograma correspondiente a concentración 0 mM de IL, los dos únicos picos que aparecen separados antes del EOF son los correspondientes a aquellos CBRs cargados a pH 9.0, mientras que la mayoría de los CRBs, al ser neutros a ese pH, no se separan, apareciendo una gran banda junto con el EOF. Se observa asimismo, que a medida que aumenta la concentración de IL la separación mejora ya que los CRBs se separan no sólo en función de su relación masa/carga sino también en función de la interacción de éstos con la micela formada por el IL. La concentración óptima que se seleccionó finalmente fue 20 mM pues se obtenía una buena separación de los analitos, con una mejora de la relación S/N y tiempos de análisis relativamente cortos.

4.1.4 Utilización de modificadores orgánicos

Una vez establecida la composición del medio de separación (tampón bicarbonato 35mM, pH 9.0 y tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolium 20mM), se evaluó la adición de diferentes modificadores orgánicos. A partir de la bibliografía existente [55,57], se vio que los modificadores orgánicos más comúnmente empleados en CE son acetonitrilo, metanol e isopropanol. Estos modificadores se añaden a la disolución de separación para producir cambios en las propiedades conductoras de dicha disolución y con ello conseguir una mejora en la resolución entre picos más próximos.

Como se puede ver en la figura 19 el uso de modificadores orgánicos, añadidos al tampón de separación, proporcionaba unos máximos de absorbancia dentro de la zona de análisis que impedían la detección de algunos de los plaguicidas en estudio por lo que se descartó su uso. El empleo de un segundo líquido iónico, el 1-etil-3-metilimidazolium tampoco proporcionó una mejora de la resolución entre picos, ya que zonas del electroferograma que estaban bien resueltas, al cambiar la composición del medio, empeoraban.

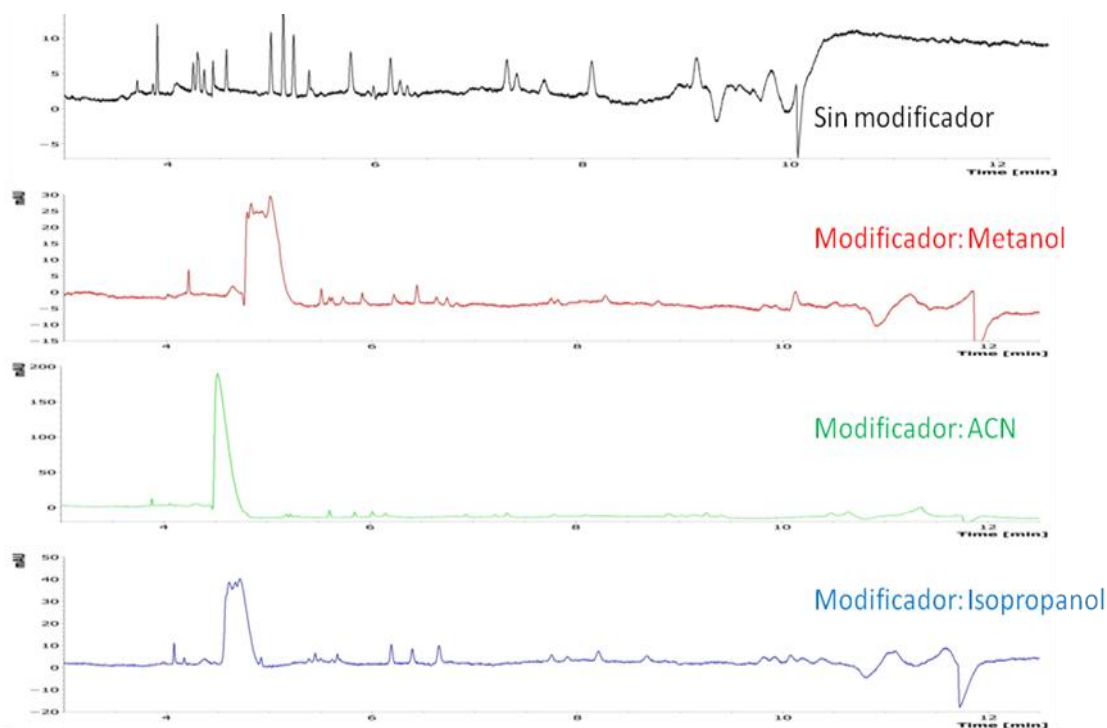


Figura 19. Utilización de modificadores orgánicos

[57] S.M. Mowongela, A. Numan, N.L. Gill, R.A. Agbaria, I. M. Warner, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6089.

4.1.5 Optimización del voltaje

En esta etapa de optimización de la separación, se realizó un barrido de voltaje entre -20 y -30 kV. El voltaje es negativo ya que el líquido iónico es catiónico y queremos que los analitos salgan antes del flujo electrosmótico. La disolución tampón empleada para este estudio era bicarbonato a una concentración 35 mM (pH 9), IL como medio micelar a una concentración 20 mM.

Para ello se inyectó una disolución de 15 CRBs a concentración de 5 mg L⁻¹ para cada uno, disueltos en el BGE, en modo hidrodinámico aplicando una presión de 35 mbar durante 5 s. La temperatura del capilar fue de 25 °C.

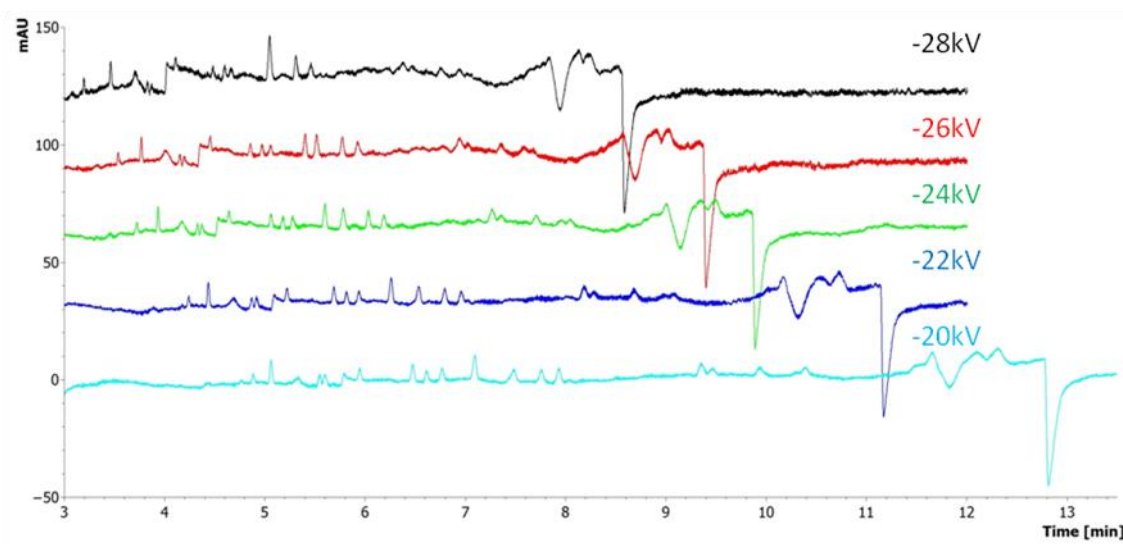


Figura 20. Optimización del voltaje

El voltaje óptimo para nuestra separación se establece en -22 kV ya que, según se observa en los electroferogramas recogidos en la figura 20, a medida que aumenta el voltaje se reducen los tiempos de análisis y como consecuencia se juntan algunos picos, además de perder eficiencia en la separación. Por ello decidimos dejar -22 kV como óptimo, ya que el valor de voltaje seleccionado proporciona una correcta separación de los CRBs y un tiempo de análisis aceptable.

4.1.6 Optimización de la temperatura

Para la optimización de la temperatura se realizó un barrido de temperatura entre 20 y 35 °C. La disolución tampón empleada para este estudio era bicarbonato, a una concentración 35 mM (pH 9) y IL a una concentración de 20 mM. La disolución empleada contenía los 15 CRBs a concentración de 5 mg L⁻¹, disueltos en el BGE e inyectada de modo hidrodinámico aplicando una presión de 50 mbar durante 5 s.

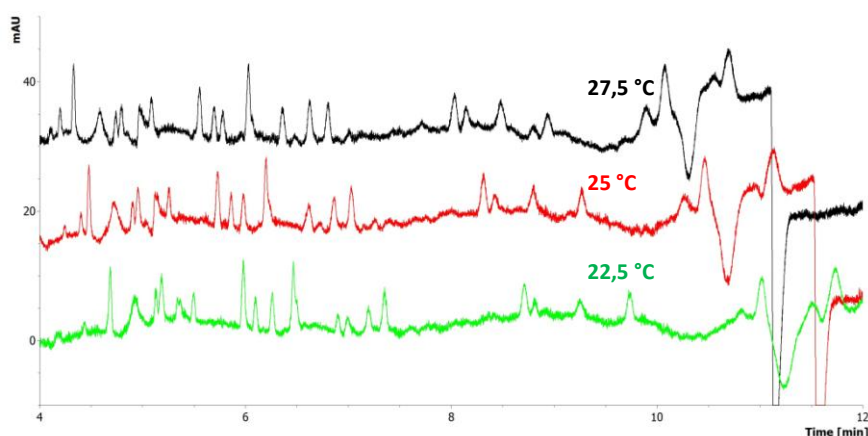


Figura 21. Optimización de la temperatura

A medida que aumentaba la temperatura los tiempos de análisis se acortaban considerablemente hasta 25 °C sin perder resolución. A partir de este valor algunos picos se solapaban, por ello se seleccionó éste como valor óptimo (Figura 21).

4.1.7 Optimización del tiempo de inyección

Una vez optimizada la temperatura, se procedió a la optimización del tiempo de inyección manteniendo una presión constante de 50 mbares para intentar conseguir un aumento en la sensibilidad del método. Se usó una disolución de los 15 CRBs, a una concentración de 5 mg L⁻¹, disueltos en el BGE e inyectada de modo hidrodinámico. La temperatura del capilar fue de 25 °C. El intervalo estudiado estuvo comprendido entre 5 y 25 s.

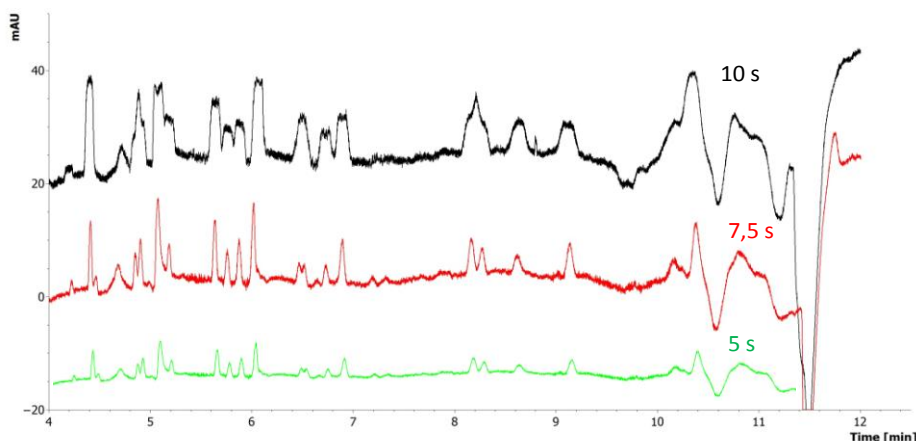


Figura 21. Optimización del tiempo de inyección

Como se puede observar en la figura 21 al aumentar el tiempo de inyección, el volumen de muestra inyectado aumenta y como consecuencia los picos se ensanchaban e incluso se perdía la separación entre algunos de ellos para un tiempo de inyección de 10 segundos, por ello se seleccionó un tiempo de 7,5 s como compromiso entre el aumento de señal y la resolución entre picos.

4.1.8 Estrategias para incrementar la sensibilidad: preconcentración en el capilar y empleo de capilar burbuja

A continuación se ensayaron diferentes estrategias para incrementar la sensibilidad del método en desarrollo.

A) En primer lugar se probaron diferentes metodologías de preconcentración en el propio capilar. Una de ellas es la conocida como “apilamiento” o *stacking*, [58-60] cuya modalidad más usual consiste en disolver la muestra en agua pura, tampón diluido o disolvente orgánico y colocarla entre dos porciones del tampón empleado en la separación. Esta zona de muestra tendrá una fuerza iónica notablemente inferior al resto del capilar.

[58] A. Šlampová, Z. Malá, P. Pantůčková, P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 34 (2013) 3.

[59] H.Y. Xie, Y.Z. He, W.E. Gan, G.N. Fu, L. Li, F. Han, Y. Gao, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3353.

[60] M.C. Breadmore, A.I. Shalan, H.R. Rabanes, D. Gstoettenmayr, A.S. Abdul Keyon, A. Gaspar, M. Dawod, J.P. Quirino, *Electrophoresis* 34 (2013) 29.

Cuando se aplica un voltaje elevado a lo largo del capilar, la fuerza del campo eléctrico es considerablemente más alta en la zona de la muestra. Como consecuencia, los iones de la muestra se mueven rápidamente hasta que llegan al tampón donde su velocidad cae debido a la diferencia de fortaleza del campo eléctrico. Por tanto, la muestra es focalizada eléctricamente o apilada (*stacked*), y la concentración en esa zona del capilar aumenta.

La otra es una variación de *stacking* denominada “*barrido*” o *sweeping*, que se realiza en modo MEKC [61-63]. Dicho proceso consiste en disolver la muestra en un tampón de la misma composición que el tampón electroforético de fondo (BGE) pero exento de micelas. Con esta metodología se consigue focalizar los analitos en una banda muy estrecha dentro del capilar, aumentando así el volumen de muestra que se puede inyectar sin ninguna pérdida de eficacia. Este fenómeno implica la acumulación de los analitos cargados y neutros en la fase pseudoestacionaria que penetra en la zona de muestra (BGE libre de micelas), produciendo un efecto de enfoque de los analitos.

- **Stacking:** La disolución de 15 CRBs se preparó en agua y se inyectó en modo hidrodinámico aplicando una presión de 50 mbar durante 7.5 s. El voltaje empleado fue de -25 kV, y la temperatura del capilar 25 °C.
- **Sweeping:** La disolución de 15 CRBs se preparó en bicarbonato 35 mM y se inyectó en modo hidrodinámico aplicando una presión de 50 mbar durante 7.5 s. El voltaje empleado era de -25 kV, y la temperatura del capilar 25 °C.

Podemos concluir, tras observar los electroferogramas correspondientes a cada tipo de preconcentración (figura 22), que no conseguimos mejorar al comparar con los resultados obtenidos previamente, por tanto descartamos esta opción.

[61] J.P. Quirino, S. Terabe, *Science* 282 (1998) 465.

[62] M. Silva, *Electrophoresis* 30 (2009) 50.

[63] A.T. Aranas, M. Guidote, J.P. Quirino, *Anal. Bioana.l Chem.* 394 (2009) 175.

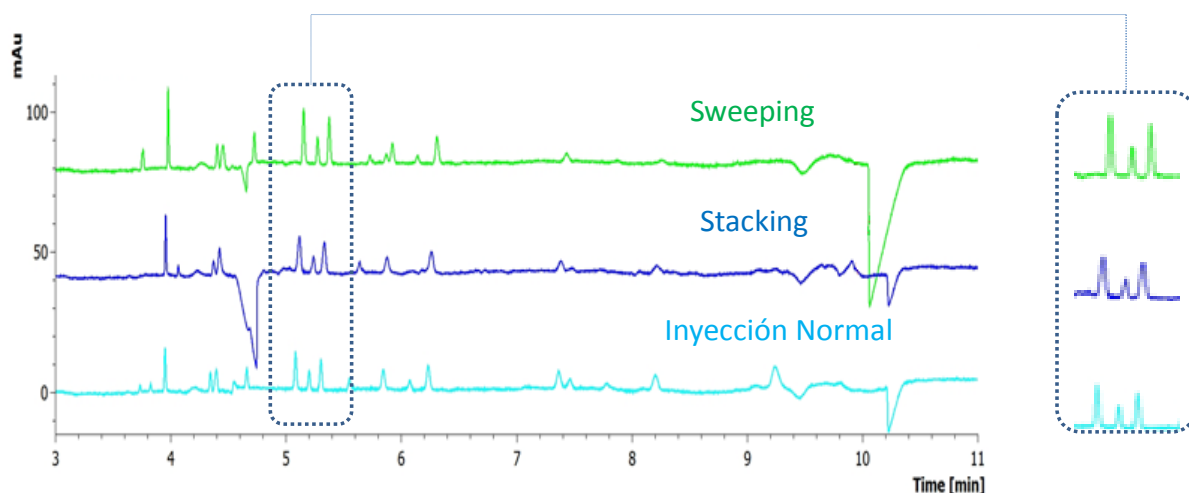


Figura 22. Tipos de preconcentración *on-line* ensayados

Según la zona ampliada sweeping aumenta sensibilidad, en cambio a partir de 7 min en sweeping desaparecen picos con respecto a inyección normal.

B) Empleo de capilar burbuja

Como nuestro objetivo era mejorar la sensibilidad del método y la relación S/N, se procedió a la utilización de un capilar burbuja. Las dimensiones eran una longitud total de 64,5 cm (longitud efectiva de 56 cm) y un diámetro interno de 75 μm . En la figura 23 se muestra un electroferograma empleando un capilar burbuja y el correspondiente electroferograma obtenido con una ventana de detección normal, manteniendo el resto de condiciones constantes.

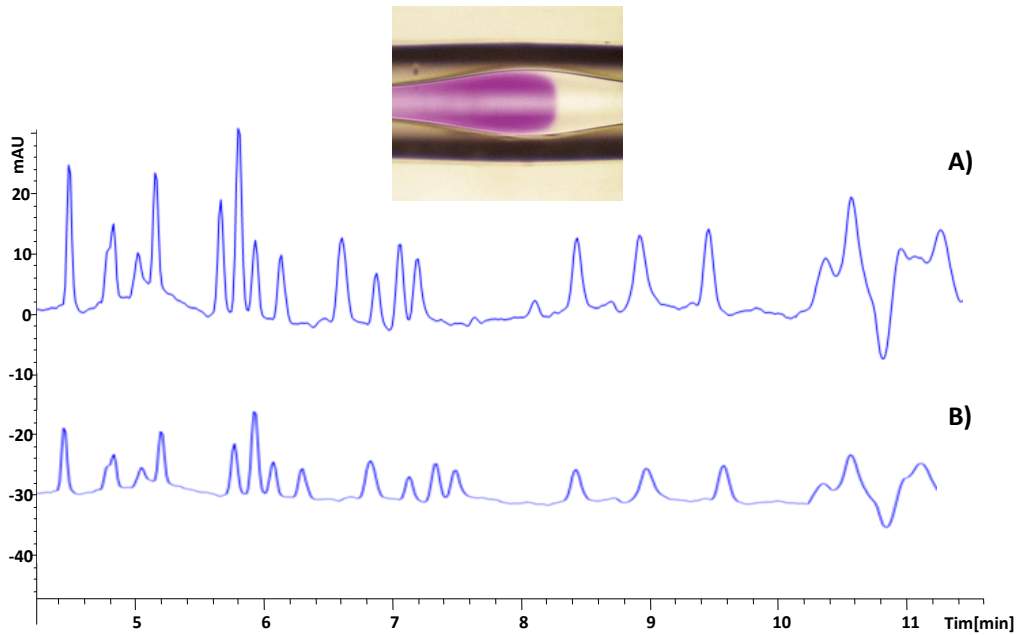


Figura 23. A) Con capilar burbuja y **B)** Con capilar normal

El uso del capilar burbuja ha permitido conseguir un incremento en la sensibilidad, aumentando aproximadamente dos veces la señal obtenida sin pérdida en la calidad de la separación.

4.1.9 Resumen de la optimización de variables y elección de carbamatos para el análisis

En la tabla 5 se puede ver un resumen de las variables que se han optimizado:

Tabla 5. Resumen de la optimización de variables

pH	9.0
Tampón	Bicarbonato 35 mM
Líquido Iónico	Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolium 20mM
Voltaje	-22 kV
Temperatura	25 °C
Tiempo de inyección	7,5 s
Presión	50 mbares

Para la asignación de los diferentes picos en el electroferograma obtenido, empleando las condiciones óptimas establecidas, se fueron realizando inyecciones individuales de cada analito. Al final, de los 15 CRBs iniciales nos quedamos con 12, los cuales eran: ASL, ALD, PRC, MTL, CBZ, BY, PX, CF, FEN, ETH, ISP, NP. Los dos picos marcados con estrella roja en el electroferograma, se deben a que cuando se inyectaba individualmente cada analito se observaba que todos ellos daban, además de la señal principal, estas otras dos señales. Esto se puede ver en las figuras 24.

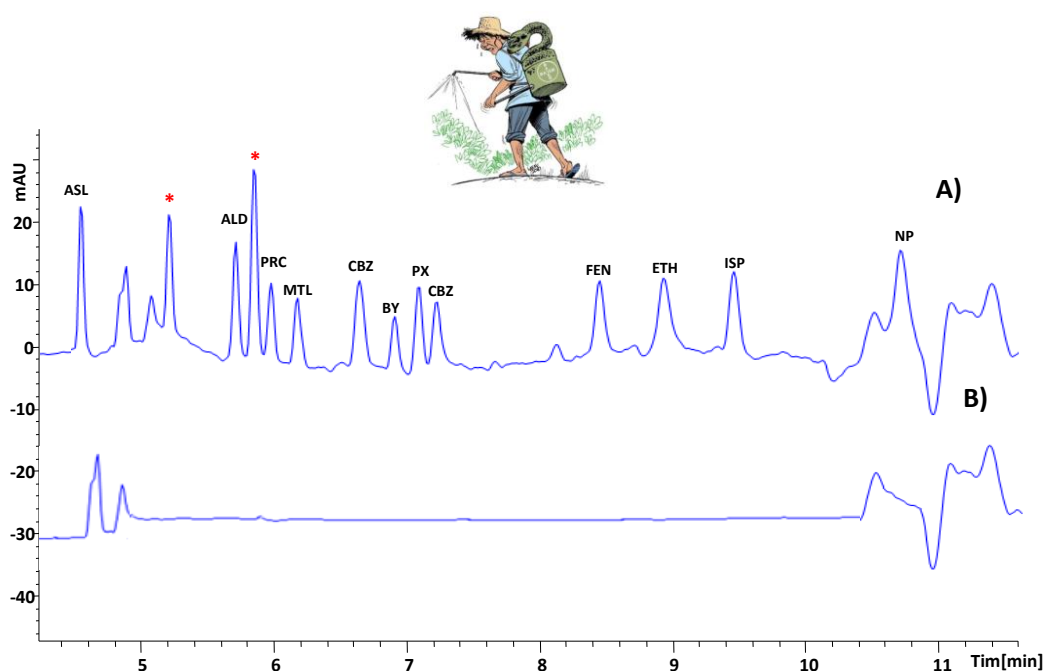


Figura 24. A) Electroferograma correspondiente a una disolución patrón de los 12 CRBs seleccionados, a una concentración de 5 mg L^{-1} , obtenido en las condiciones óptimas establecidas. **B)** Electroferograma correspondiente a un blanco

4.2 Optimización del tratamiento de muestra: microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Como se ha comentado en la introducción, los principales factores que afectan al proceso de extracción son: la naturaleza y el volumen del disolvente dispersante, la naturaleza y el volumen del disolvente extractante y el pH [55]. Como criterio para seleccionar los valores óptimos, se estudió la eficacia del proceso de DLLME, calculada mediante los porcentajes de recuperación al aplicar el método MEKC, estimados como cociente entre el área del pico de cada analito, obtenida para la muestra fortificada antes del tratamiento y la obtenida para una muestra libre de analito y fortificada al final del tratamiento con la misma concentración que debería haber en el extracto reconstituido si el rendimiento de la extracción fuera del 100%. De este modo es posible evaluar las pérdidas sufridas mediante el proceso de tratamiento de muestra.

Todos los ensayos se realizaron con 5 mL de de una disolución de agua de una concentración de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los CRBs en estudio. Las condiciones de partida empleadas para la optimización fueron las siguientes: 750 μL de disolvente extractante, 1500 μL de disolvente dispersivo, agitación manual durante 1 min., centrifugación durante 2 min a 5000 rpm y posterior secado con corriente de N_2 y recomposición en 0,25 ml de tampón electroforético a pH 9.

4.2.1 Optimización de la naturaleza de disolvente extractante

Los disolventes seleccionados para el estudio fueron: cloroformo, diclorometano, tetracloruro de etileno y 1,2 dibromometano. La extracción dispersiva se llevó a cabo en tubos falcon que contenían 5 mL de disolución de agua y se usó metanol como dispersante en todos los casos.

Cualitativamente se observa una mejor separación de las fases utilizando cloroformo como extractante, además de ofrecer las mejores recuperaciones para todos los analitos salvo CBZ, BY y CF, como puede verse en la figura 26:

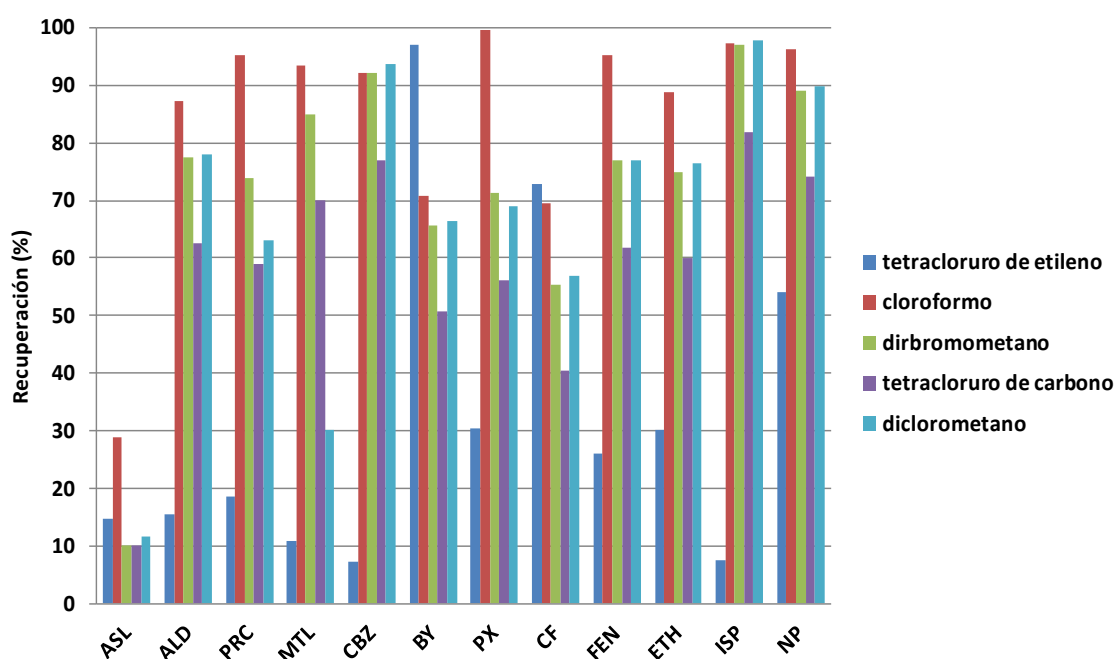


Figura 26. Optimización de la naturaleza del extractante

4.2.2 Optimización de la naturaleza del disolvente dispersante

Seguidamente se estudió la naturaleza del disolvente dispersante, ensayándose los siguientes disolventes: MeOH, ACN, ISOB e IPA.

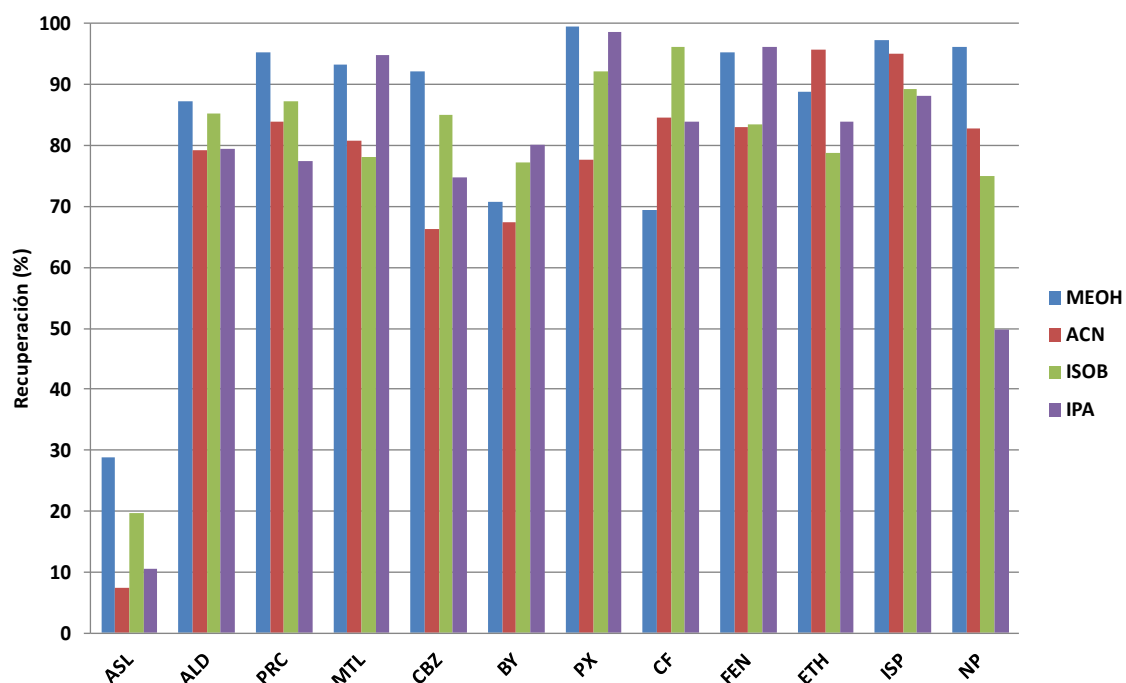


Figura 27. Optimización de la naturaleza del dispersante

Según se observa en la figura 27, el disolvente más adecuado para la mayoría de los analitos en estudio es el metanol. Podemos concluir a partir de estas dos experiencias que los disolventes óptimos son: cloroformo como extractante y metanol como dispersante.

4.2.3 Optimización del pH

Llevamos a cabo una optimización del pH para ver si se conseguía una mejor recuperación de los CRBs que podrían estar cargados a los diferentes pHs evaluados (3, 5 y 7). Para hacer esta optimización el valor de pH del medio de extracción se modificó utilizando una disolución tampón de fosfato 50 mM, además de compararlo con la muestra sin tamponar.

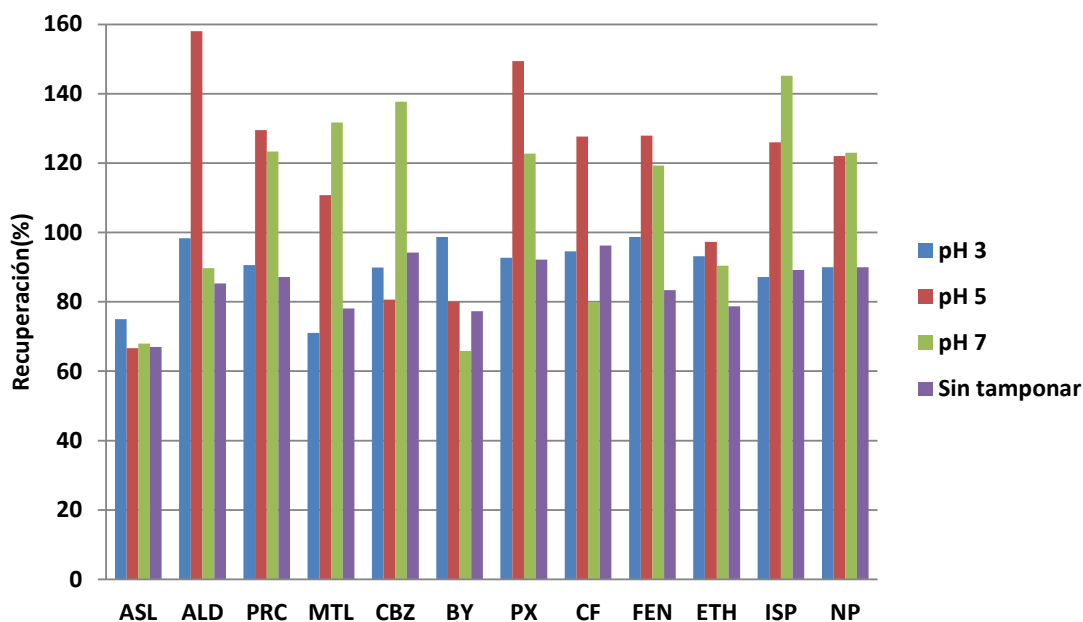


Figura 28. Optimización del pH

Como se puede ver en la figura 28, con valores de pH 5 y 7 se obtienen recuperaciones considerablemente superiores al 100% para varios de los analitos en estudio. Además con un valor de pH 3 no se mejora la recuperación de ASL por tanto decidimos seguir trabajando sin usar medio tamponado.

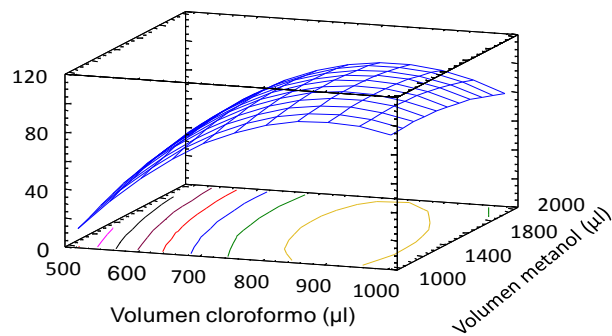
4.2.4 Diseño de experimentos para la optimización de los volúmenes

Con el objetivo de conocer perfectamente la relación entre dos de las variables más influyentes en este tipo de extracción, como son el volumen de extractante y de dispersante, se procedió al empleo de un diseño de experimentos, el cual nos da el valor óptimo, además de las interacciones existentes en el sistema. Se utilizó un diseño factorial completo 3^2 con tres réplicas del punto central. El volumen de cloroformo fue estudiado en el rango 500-1000 μL y el volumen de metanol en el rango 1000-2000 μL . Las diferentes experiencias se llevaron a cabo de forma aleatoria con el objetivo de minimizar los efectos de las variables incontroladas. El promedio de la recuperación calculada para todos los CRBs fue considerado como variable respuesta.

En la figura 29a) se muestra la superficie de respuesta obtenida en la cual se observa que el valor máximo corresponde a los volúmenes de 870 μL de cloroformo y 1500 μL

de MeOH. En la figura 29b) se recoge el gráfico de Pareto en el que se pueden ver las interacciones entre ambos disolventes. La componente A correspondiente al volumen de extractante tiene un efecto positivo, es decir que a medida que aumenta este volumen la recuperación es mejor. El mismo efecto se observa para la componente B, pero como puede observarse en este gráfico su efecto es menor, ya que el rango estudiado estaba bastante próximo al óptimo.

a)



b)

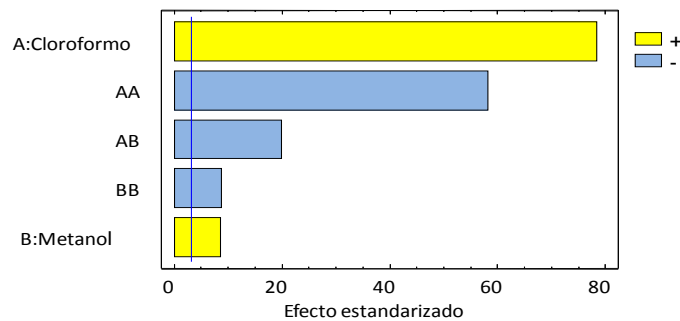


Figura 29. a) Superficie de respuesta obtenida en la optimización del volumen de extractante y dispersante usando un diseño factorial completo 3^2 **b)** Gráfico de Pareto estandarizado para la recuperación media (amarillo efecto positivo; azul efecto negativo)

A modo de resume se recogen en la tabla 6 los valores óptimos encontrados para el procedimiento de DLLME:

Tabla 6. Óptimos de la DLLME

Extractante	Cloroformo
Dispersante	Metanol
Volumen Extractante (μL)	870
Volumen de dispersante (μL)	1500
pH	Sin fijar

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA EL ANÁLISIS EN MUESTRAS DE ZUMO



El método analítico propuesto para el análisis de los carbamatos seleccionados se validó en términos de linealidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), precisión y veracidad, empleando para ello un calibrado en presencia de matriz. El zumo de tomate fue la matriz seleccionada para llevar a cabo dicha validación.

5.1 Parámetros de calidad del método

Se construyeron las correspondientes rectas de calibrado en presencia de matriz, usando zumo de tomate libre de los plaguicidas en estudio. Las rectas de calibrado para los analitos seleccionados se obtuvieron mediante fortificación de las muestras, antes del tratamiento, con concentraciones crecientes. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de 5 niveles: 25, 50, 75, 150, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos los CRBs en estudio. Se prepararon 3 réplicas a cada nivel de concentración y fueron inyectadas tres veces. Las funciones de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico de los CRBs.

Los parámetros estadísticos, calculados por medio de regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la tabla 7. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas para los plaguicidas son lineales en el rango estudiado. Los LODs y LOQs se calcularon a partir de la relación señal/ruido (S/N).

Tabla7. Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto (concentración frente a áreas de pico.

Analitos	LOD (μgL^{-1})	LOQ (μgL^{-1})	RDL	LMR ^a (μgL^{-1})	R ²
ASL	5	18	18-250	500	0.994
ALD	4	14	14-250	20	0.993
PRC	5	17	17-250	1000	0.996
MTL	5	17	17-250	NO ESTABLECIDO	0.99
CBZ	0.9	3	3-250	300	0.993
BY	0.7	3	3-250	300	0.990
PX	0.4	1	1-250	50	0.990
CF	0.6	2	2-250	20	0.994
FEN	0.5	2	2-250	NO ESTABLECIDO	0.995
ETH	0.5	2	2-250	NO ESTABLECIDO	0.993
ISP	0.5	2	2-250	NO ESTABLECIDO	0.991

^a LMR establecido para tomate [27]

A continuación se muestra en la figura 30 los electroferogramas obtenidos para la muestra de tomate A) fortificada con $50 \mu\text{g L}^{-1}$ y B) sin fortificar. Como puede observarse el NP se confunde con el EOF, por esta razón este analito no se ha podido analizar con el método propuesto para el tipo de muestras.

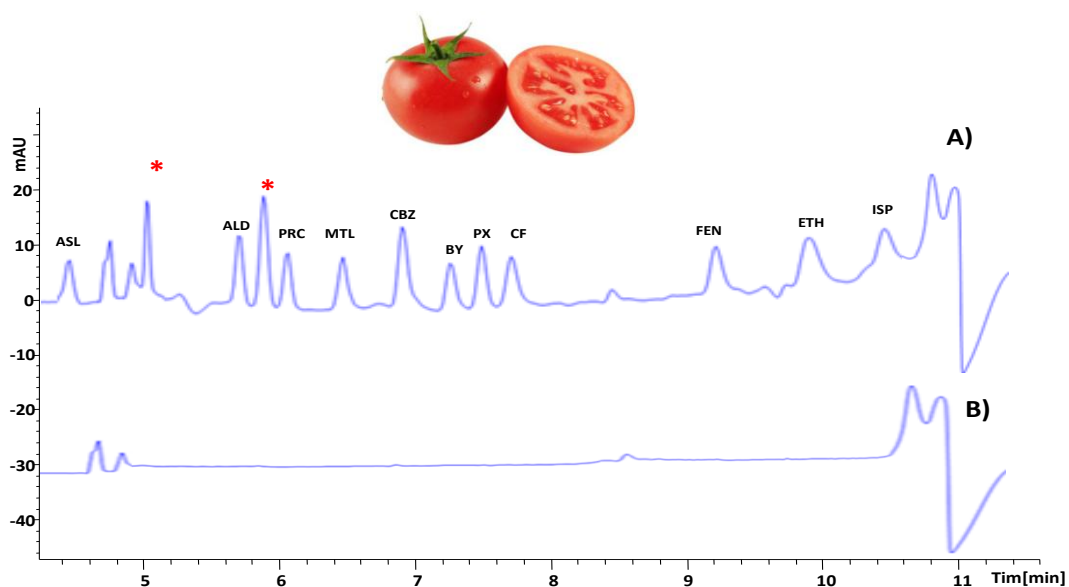


Figura 30. A) Zumo de tomate fortificado con $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de CRBs B) Blanco (Zumo de tomate sin fortificar)

5.2 Estudio de la precisión

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día, mediante la aplicación repetida del procedimiento de DLLME-MEKC a tres muestras (réplicas experimentales) para cada nivel de concentración ensayado e inyectadas cada una tres veces (réplicas instrumentales). Los niveles de concentración fueron: 25, 50, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada uno de los analitos.

La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico se muestran en la tabla 8. Como se puede observar, la precisión fue aceptable en todos los casos.

Tabla 8. Estudio de precisión para el método propuesto.

	ASL	ALD	PRC	MTL	CBZ	BY	PX	CF	FEN	ETH	ISP
Repetibilidad intradia DER (%) (n=9)											
Nivel 1 ^a	7,7	3,5	3,8	2,1	4,9	7,4	8,7	6,7	8,0	5,9	8,9
Nivel 2 ^b	6,2	1,6	2,9	1,8	3,6	5,2	4	4,1	4,6	1,9	4,9
Nivel 3 ^c	4,3	1,2	1,2	1,1	1,4	2,2	1,1	1,7	2,1	0,8	2,0
Precisión intermedia DER (%) (n=15)											
Nivel 1 ^a	8,9	4,7	4,1	4,3	5	8,3	8,9	6,8	8,6	6,2	8,9
Nivel 2 ^b	8,9	1,7	3	3,8	3,9	7,9	5,1	4,3	4,9	2,1	5,2
Nivel 3 ^c	7,6	1,6	1,4	1,5	1,6	2,7	1,5	1,9	2,5	1,3	2,4

^a Nivel 1: 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, ^b Nivel 2: 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ y ^c Nivel 3: 150 $\mu\text{g L}^{-1}$

5.3 Estudio de la veracidad

Para comprobar la veracidad del método propuesto se llevaron a cabo estudios de recuperación en muestras de zumo de tomate, uva blanca y uva roja, libres de los diferentes CRBs en estudio. Las muestras se doparon con la mezcla de los 11 plaguicidas (ASL, ALD, PIR, METO, CBZ, BY, PX, CAR, FENO, ETH, ISO) a diferentes niveles de concentración (25, 50, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$) cada uno de ellos. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. Las recuperaciones absolutas fueron calculadas comparando las áreas de pico relativas de muestras de zumo dopadas al principio del procedimiento de DLLME con una muestra dopada al final del tratamiento de muestra.

Las recuperaciones estuvieron comprendidas entre el 70 y el 97 % en todos los casos, con DER aceptables ya que están dentro de los límites establecidos por la legislación (70-120 %) [64]. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Recuperaciones obtenidas en muestras de zumo de tomate, uva blanca y uva roja dopadas con los 11 plaguicidas a distintos niveles de concentración.

			ALD	PRC	MTL	CBZ	BY	PX	CF	FEN	ETH	ISP
Zumo Tomate	Nivel 1 ^a	R (%)	85,1	92,8	90,9	89,4	88,5	85,6	85,5	83,5	82,2	84,0
		(DER)	(3,5)	(3,9)	(2,2)	(4,9)	(7,4)	(8,6)	(6,7)	(8,0)	(5,8)	(8,6)
	Nivel 2 ^b	R (%)	91,3	92,3	92,1	86,6	87,3	87,8	88,5	87,9	90,5	84,3
		(DER)	(1,8)	(2,9)	(1,7)	(3,6)	(5,2)	(4,1)	(4,3)	(4,6)	(1,9)	(4,8)
	Nivel 3 ^c	R (%)	97,3	95,3	90,5	91,8	94,9	96,6	96,4	97,4	96,6	94,5
		(DER)	(1,2)	(1,3)	(1,4)	(1,3)	(2,2)	(1,1)	(1,7)	(2,1)	(0,9)	(2,0)
Zumo Uva blanca	Nivel 1 ^a	R (%)	70,4	76,1	74,6	74,2	79,0	78,1	75,8	71,4	77,9	79,8
		(DER)	(5,9)	(6,9)	(7,4)	(3,5)	(6,7)	(5,0)	(5,1)	(6,6)	(3,6)	(3,6)
	Nivel 2 ^b	R (%)	76,8	77,9	74,3	73,2	81,2	79,4	80,9	76,4	79,4	80,8
		(DER)	(5,6)	(4,6)	(6,4)	(4,5)	(8,5)	(3,5)	(3,7)	(3,7)	(3,1)	(3,4)
	Nivel 3 ^c	R (%)	89,5	78,5	81,9	80,1	80,6	79,8	87,7	84,4	81,8	80,1
		(DER)	(2,2)	(2,7)	(2,3)	(5,4)	(2,8)	(3,3)	(2,8)	(2,6)	(1,0)	(1,6)
Zumo uva roja	Nivel 1 ^a	R (%)	70,5	81,1	80,7	75,5	79,7	84,15	92,5	73,9	90,2	89,8
		(DER)	(5,9)	(6,9)	(7,3)	(3,5)	(6,7)	(4,9)	(5,1)	(6,6)	(3,6)	(3,6)
	Nivel 2 ^b	R (%)	83,5	87,2	81,3	87,2	85,1	74,1	76,6	70,6	88,1	89,0
		(DER)	(5,6)	(4,6)	(6,3)	(4,5)	(8,5)	(3,5)	(3,6)	(3,7)	(3,1)	(3,4)
	Nivel 3 ^c	R (%)	89,1	92,3	87,4	86,2	86,5	80,7	88,9	85,5	92,8	91,4
		(DER)	(2,1)	(2,7)	(2,3)	(5,4)	(2,8)	(3,3)	(2,8)	(2,6)	(1,0)	(1,6)

^a Nivel 1: 25 µg L⁻¹, ^b Nivel 2: 50 µg L⁻¹ y ^c Nivel 3: 150 µg L⁻¹

[64] Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Commission 2011, SANCO/12495/2011.

Los electroferogramas correspondientes al zumo de uva blanca y roja fortificados y sus correspondientes blancos se muestran a continuación (Figuras 31-32).

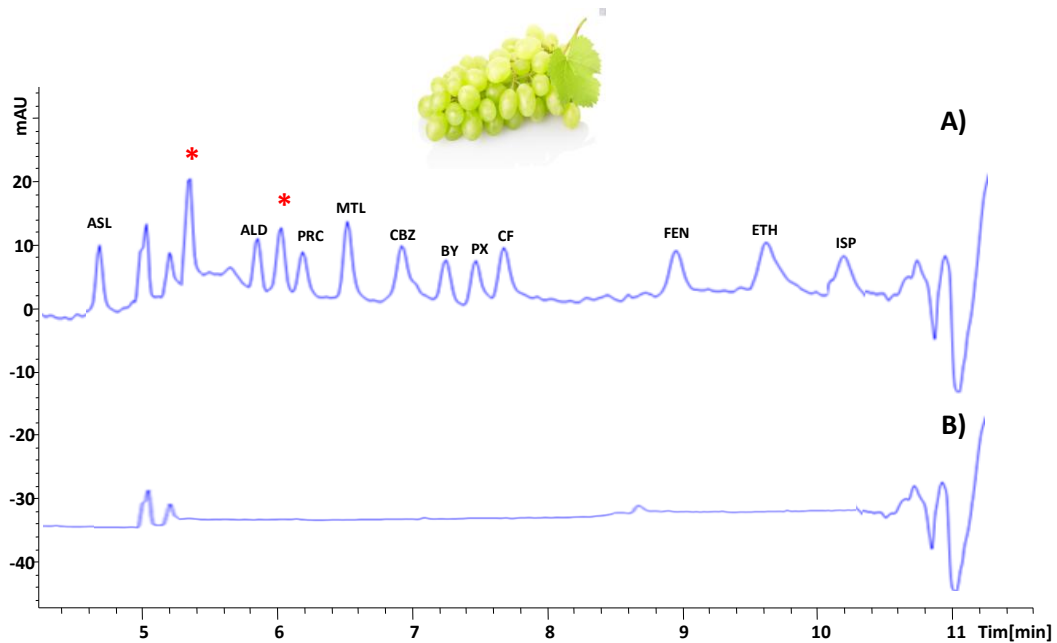


Figura 31. Electroferograma del zumo de uva blanca **A)** fortificado con los CRBs y **B)** blanco.

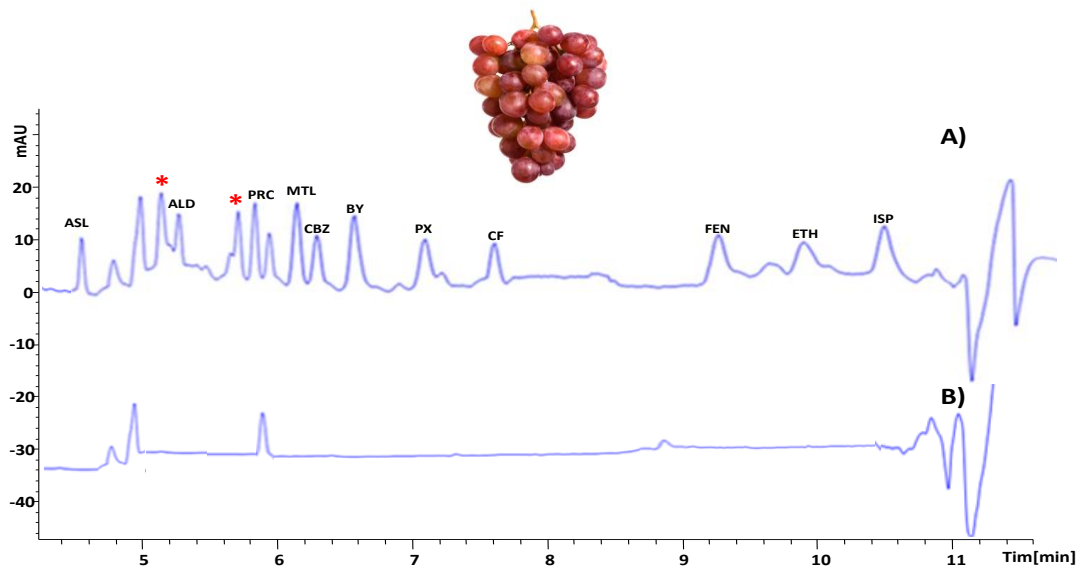


Figura 32. Electroferograma del zumo de uva roja **A)** fortificado con los CBRs y **B)** blanco.

6. CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

- En esta memoria se ha desarrollado un nuevo método de separación empleando como técnica MECK donde se introduce un líquido iónico (tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolium) como medio micelar, obteniéndose una buena separación de 11 carbamatos en menos 12 min.
- Además se ha desarrollado una nueva metodología para la extracción de estos plaguicidas en zumos de tomate, uva blanca y uva roja. Se han optimizado todas las variables que influyen en el proceso de extracción.
- El método DLLME-MEKC ha sido caracterizado en cuanto a sus parámetros de calidad y validado para el análisis de muestras de zumo de tomate, obteniéndose unos límites de detección y cuantificación por debajo de los valores establecidos por la legislación como límites máximos de residuos de plaguicidas en este tipo de alimentos.
- La precisión del método (tanto intradía como interdía), es aceptable en todos los casos.
- Los ensayos de recuperación realizados demuestran que el método propuesto cumple con los requisitos, relacionados tanto con porcentajes de recuperación [64] como con DER, establecidos por la legislación para los métodos de determinación de carbamatos en zumos de tomate, uva blanca y uva roja.
- El método es rápido, simple y robusto al combinar las ventajas de la DLLME (simple, rápida, de gran eficiencia en la extracción, posibilidad de altos factores de preconcentración y bajo consumo de disolventes orgánicos) con las ventajas de la electroforesis capilar (técnica miniaturizada, económica, con cortos tiempo de análisis y gran eficacia). Por todo ello puede considerarse como una estrategia dentro de la Química Analítica Verde, al plantear un método de bajo impacto ambiental.

- Los resultados de este trabajo serán comunicados en modo de cartel en las XIII Reunión de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines, a celebrar en Tenerife del 8-11 de Octubre de 2013. Los resultados obtenidos han sido enviados para su publicación en la revista Talanta, de alto índice de impacto en el campo de la Química Analítica.

7. ABREVIATURAS



7. ABREVIATURAS

En la mayoría de los casos se ha empleado la abreviatura o acrónimo anglosajón debido a su empleo más generalizado.

ACN: Acetonitrilo

AESAN: Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición

ALD: Aldicarb

ALDSFX: Aldicarb sulfóxido

ASL: Asulam

BF: Benfurocarb

BGE: Electrolito de fondo

BY: Benomil

CBZ: Carbendazima

CE: Electroforesis capilar

CF: Carbofurano

CRB: Carbamato

CTAB: Cetil-Trimetil-amino- bromuro

DER: Desviación estándar relativa

DL₅₀: Dosis letal media

DLLME: Microextracción liquido-liquido dispersiva

EOF: Flujo electroosmótico

EPA: Environmental Protection Agency

ETH: Etiofencarb

FAO: Food and Agriculture Organization of United Nations

FEN: Fenobucarb

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IL: Líquido iónico

IPA: Isopropanol

ISOB: Isobutanol

ISP: Isoprocarb

LLE: Extracción líquido-líquido

LMR: Límite máximo de residuo

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MeOH: Metanol

MEKC: Cromatografía electrocinética micelar

MTL: Metolcarb

NP: Napropamida

PRC: Pirimicarb

PX: Propoxur

RASFF: Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos

RDL: Rango dinámico lineal

RTIL: Líquidos iónicos a temperatura ambiente

TH: Tiodicarb

SDS: Dodecil sulfato sódico

SPEE: Extracción en fase sólida

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

UE: Unión Europea

