



INSTITUTO
TECNOLÓGICO
AGRARIO DE
CASTILLA Y LEÓN



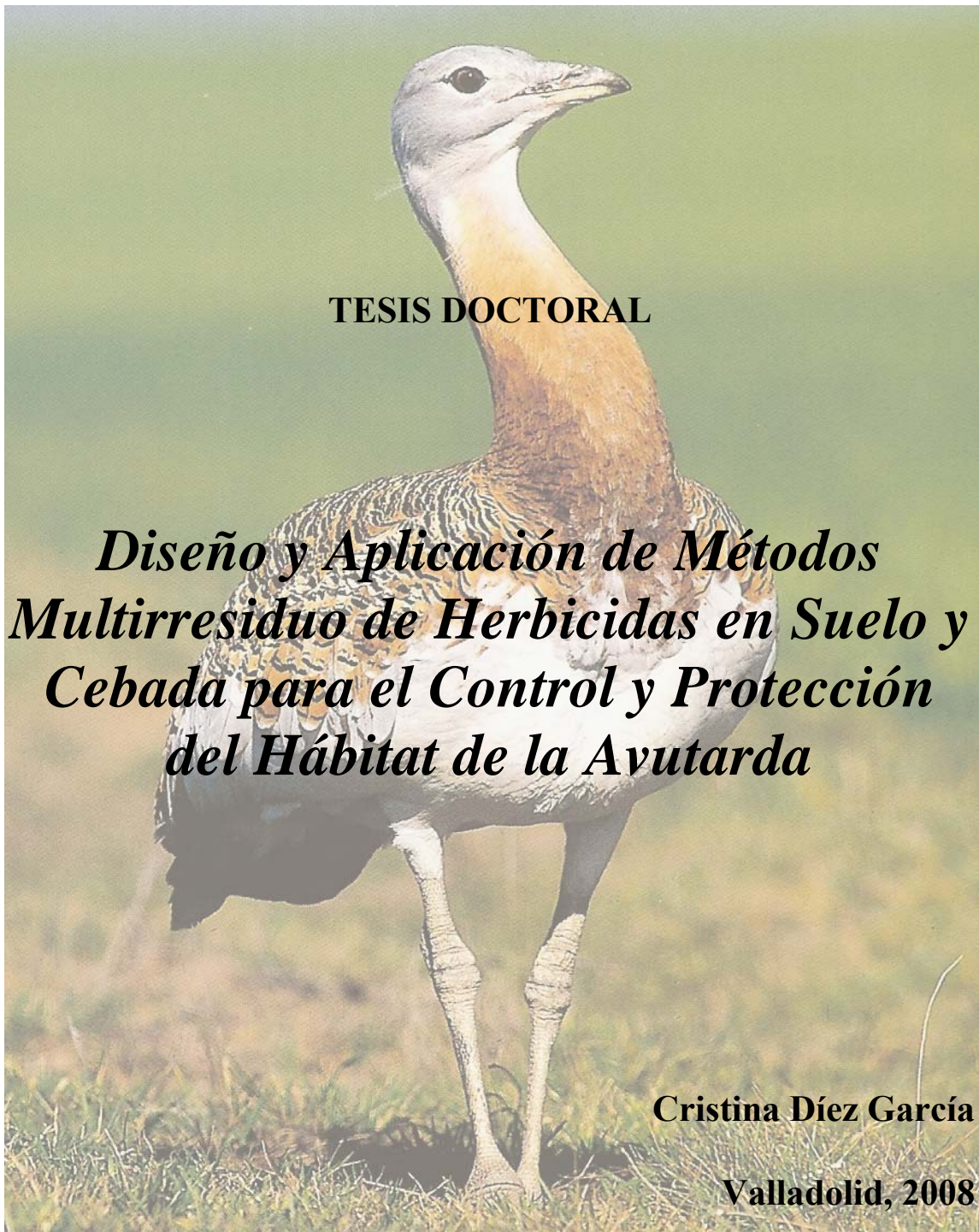
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO AGRARIO DE
CASTILLA Y LEÓN

TESIS DOCTORAL

***Diseño y Aplicación de Métodos
Multirresiduo de Herbicidas en Suelo y
Cebada para el Control y Protección
del Hábitat de la Avutarda***

Cristina Díez García

Valladolid, 2008



Fotografía de la Portada: Carlos Sánchez Alonso y Juan Martín Simón.
Del Libro: “Tierra de Avutardas. La llanura cerealista de Castilla y León”.
Editado por la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Castilla y León. 1995.

A mi madre

*“¡Y qué hermosa la tristeza reposada de ese mar
petrificado y lleno de cielo!”*

Miguel de Unamuno



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 de 21 de enero)**

D. Enrique Barrado Esteban, con D.N.I. nº 12213723 X,
Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias,

Dña. Pilar Marinero Díez, con D.N.I. nº 9307548 T,
Investigadora del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León,

como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Diseño y Aplicación de Métodos Multirresiduo de Herbicidas en Suelo y Cebada para el Control y Protección del Hábitat de la Avutarda”,

presentada por Dña. Cristina Díez García
alumna del programa “Química Analítica y Medio Ambiente” (M07)
impartido por el Departamento de Química Analítica

autorizan la presentación de la misma, considerando que:

Se trata de un trabajo original e inédito, de importancia tanto desde el punto de vista teórico, por los aspectos relacionados con el desarrollo de nuevas metodologías, como práctico, ya que lo anterior se hace teniendo en cuenta las condiciones en que las citadas metodologías podrán desarrollarse en los organismos de control. Está bien diseñado y la cantidad de trabajo ha permitido tener un número de datos cuyo tratamiento permite llegar a conclusiones del máximo interés, por lo que también pueden considerarse importantes sus aportaciones teóricas y científicas.

Valladolid, 25 de Abril de 2008

Los Directores de la Tesis,

Enrique Barrado Esteban

Pilar Marinero Díez

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias al apoyo del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, que financió, primero con una beca de especialización y luego con una beca predoctoral, el estudio que desarrollé durante los años 2001-2006 y la estancia realizada en Holanda en 2004. A la Dra. Pilar Marinero, co-directora de esta tesis, y al Dr. Julián Atienza, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en el Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL.

Al Dr. Enrique Barrado, co-director de esta tesis, que me ha enseñado como se debe encauzar una investigación para que sea eficaz. Por haber hecho que creyera en mi trabajo, y poner todos sus conocimientos y su empeño en que esta Tesis se terminase.

A la Dirección General de la Política Agraria Comunitaria de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, por permitirme el uso de los datos relacionados con el Programa de las Estepas Cerealistas, y a la Consejería de Educación, proyecto VA029A07, por la financiación prestada.

A Alberto Pérez del Departamento de Protección Vegetal y Juan Carlos Martínez de la Subdirección de Infraestructuras Agrarias, por cederme los datos de Inforiego, así como a Avelino de Benito, del Departamento de Agronomía y Producción Vegetal, por brindarme sus datos meteorológicos.

Al profesor José María Andrés del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de Valladolid, por su ayuda para entender las reacciones químicas de derivatización.

Gracias a mi familia, en especial mis tías, por haberme apoyado durante todos estos años, por su cariño y ánimo. A mi padre, por despertar en mí la curiosidad. A mi hermano, aunque no entendiera que hacía con esos “cuadritos” todo el día. Y sobre todo a mi madre, por haber tenido una paciencia sin límites animándome en los peores momentos. Sin ella quién sabe dónde hubiese ido a parar todo esto.

A mis amigos, en especial, Silvia, Ali, Isa, Mavi, María, Raúl, Bea, Ruti, Mario, Rebeca, Paula, Silvia, Patu, Laura y Agus, por su apoyo incondicional y por todas las veces que han aguantado oirme decir eso de “cuando termine la tesis voy a ...”.

A mis compañeros del Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL, que, de una u otra manera se han visto implicados en este trabajo y por todos los buenos ratos que hemos pasado juntos. En especial a Asun, Begoña, Miguel, Anita y Chusa, por su compañía y complicidad en esta “travesía en el desierto”.

A José Manuel por su generosa ayuda prestada en los ensayos en campo, y a Estefanía por su paciencia a la hora de extraer una tonelada de suelos.

A mis compañeros del Laboratorio de Salud Pública de Zamora, por su compañerismo y comprensión durante la última etapa de la tesis.

A mis compañeros del coche, Elba, Pablo, Vale y Jesús, sufridores estoicos de la tesis durante 2 h al día, que supieron reprimir las ganas de hacerme bajar en Toro por no dejarles dormir.

Igualmente quiero expresar mi agradecimiento por su ayuda en la elaboración de esta tesis a todas las personas que aquí aparecen y a todas aquellas, que sin ser mencionadas, han cedido parte de su tiempo y su trabajo en que este documento fuera posible.

A todos y cada uno, GRACIAS.

RESUMEN

La agricultura tradicional de secano en las Estepas Cerealistas de Castilla y León ha propiciado la conservación de las mayores concentraciones mundiales de Avutarda (*Otis tarda*), una de las aves esteparias más importantes. Sin embargo, se trata de una de las especies más amenazadas por el uso indiscriminado de herbicidas. Para mejorar esta situación la Comisión Europea aprobó en 1993 el “Programa Zona de las Estepas Cerealistas de Castilla y León”, que proporciona ayudas a los agricultores que utilicen herbicidas del tipo AAA o “Baja Toxicidad” dentro de unos niveles fijados.

Este programa requiere, por tanto, el desarrollo, optimización y validación de métodos multiresiduo de extracción y análisis de herbicidas, de los que se han seleccionado 37, para controlar que los utilizados en el cultivo de cebada, mayoritario en esta zona, cumplen con la legislación vigente. Se han evaluado las técnicas HPLC-DAD, GC-AED, GC-MS, PTV-GC-TOF/MS y LC-(ESI)-MS/MS, optimizándose finalmente GC-MS. La metodología consiste en el análisis de dos alícuotas, obtenidas del tratamiento de la muestra con acetona y 1% de ácido acético que actúa de protector de los analitos termodegradables. La primera se analiza directamente, mientras que en la segunda se derivatizan los herbicidas ácidos por la adición directa de TMSH en el vial, reacción previamente optimizada mediante un diseño ortogonal.

Se ha estudiado la influencia de distintos factores en la extracción en suelos con un análisis de componentes principales, optimizando posteriormente, con otro diseño ortogonal, la agitación con acetona junto con ácido acético y agua. Análogamente, se han estudiado las condiciones de concentración de los extractos para evitar al máximo las pérdidas por volatilización, y se ha eliminado la etapa de limpieza del extracto, al no poder encontrar una universal por SPE o dSPE que no retuviera algún analito.

En el caso de la extracción en grano de cebada, se han comparado durante una estancia en Holanda, los métodos multiresiduo clásicos para material vegetal, con uno novedoso, publicado en 2003, y denominado *QuEChERS*. Posteriormente se adaptan los métodos al equipamiento existente en el ITACyL, organismo donde se efectúan los controles, ensayando además una variante denominada *Buffered QuEChERS* y extrayendo también muestras de paja. Con el *QuEChERS* las recuperaciones no alcanzan los criterios europeos y, por tanto, se escoge el método del Acetato de etilo para los herbicidas básicos y neutros, y el mini Luke acidificado para los ácidos.

Además se ha estudiado la disipación de 12 herbicidas en suelos típicos de las estepas cerealistas, mediante 3 ensayos de campo entre los años 2002-2005. Su comportamiento se describe mediante cinéticas bifásicas, y sus DT_{50} y DT_{90} hallados son, en general, inferiores a los publicados, ya que la disipación se produce rápidamente por procesos influidos por la temperatura, como la fotólisis o la volatilización, incrementados por la baja adsorción de los herbicidas en este tipo de suelo con escaso contenido en coloides. Sin embargo, los herbicidas persistentes, Trialato, Flamprop, Pendimetalina, Terbutrina e Isoproturon, mantienen cantidades residuales durante mucho más tiempo ya que no se favorecen los procesos de degradación microbiológicos debido a la baja humedad y escasa materia orgánica del suelo. Los herbicidas Fenoxiácidos se disipan adecuadamente sin dejar residuos en el suelo en el momento de la cosecha. Ninguno de los herbicidas estudiados se ha detectado en las muestras de cebada de los ensayos.

Entre los años 2002-2004 se analizaron residuos de herbicidas en un amplio muestreo de fincas agrícolas de cereal, sujetas al Programa de las Estepas Cerealistas, en los que se encontraron residuos de Clortoluron, Isoproturon, Diflufenican, Terbutrina y Trialato, normalmente en valores superiores al LMR aconsejado para suelos, 0,05 mg/kg.

ABSTRACT

The traditional dry agriculture in the Cerealian Steppes of *Castilla y León*, has aimed to preserve in this area the largest concentrations of Great Bustard found in the world, being one of the most important and threatened stepparian birds due to the indiscriminate use of herbicides. In order to improve this situation, the European Council established the “Zone Program of Cerealian Steppes of *Castilla y León*” in 1993, which provides farmers with grants while they compromise to protect the environment. Among other measures, the use of herbicides other than type AAA or “Low toxicity” is forbidden.

Therefore, the development, optimization and validation of multiresidue methods for the extraction and analysis of herbicides is needed to control their use. 37 herbicides intended for barley are selected because it is the most important crop in this region. Some different analytical techniques are evaluated (HPLC-DAD, GC-AED, GC-MS, PTV-GC-TOF/MS y LC-(ESI)-MS/MS), being GC-MS selected and optimised. The final extract in acetone and 1% acetic acid, which protects the temperature labile analytes, is split in two aliquots, the first one being readily analysed and the second one being directly derivatised in the injection port by adding TMSH in order to methylate the acidic herbicides. The reaction of derivatization is optimised by the use of an orthogonal array design.

The influence in the soil extraction recovery of some variables is also studied in a set of previous experiments analyzed by principal component analysis, being the soil extraction with acetone, water and acetic acid optimised afterwards by another orthogonal array design. The extract concentration conditions are also evaluated in order to reduce the loss by volatilization, and a clean-up step is not included due to the retention of some analytes in all the SPE or dSPE sorbents studied.

The comparison of well known conventional multiresidue plant material extraction procedures with *QuEChERS*, a new method published in 2003, is carried out for the extraction of herbicides in barley grains during a research stay in Holland. Afterwards, the methods are adapted to the equipment available in the ITACyL (Institution where the monitoring and control is develop), evaluating a modification called *Buffered QuEChERS*, and extracting barley straw as well. Recoveries with *QuEChERS* cannot fulfil the European validation criteria being, therefore, the ethyl acetate method selected for the neutral and basic herbicides, and the acidified mini Luke method adopted for the acidic extraction.

The dissipation in actual field conditions is also evaluated for 12 herbicides in a typical cerealian steppe soil among the years 2002-2005. Their behaviour is well described by a biphasic kinetic, and their DT_{50} and DT_{90} are lower than those found in the references due to the high initial degradation rate caused by volatilization and photolysis both influenced by the temperature and increased by the low herbicide sorption in this low colloid-content soil. However, the most persistent herbicides, Triallate, Flamprop, Pendimethalin, Terbutryn and Isoproturon, remain for a long time in this soil due to the low water and organic content that inhibit the microbial growth. On the other hand, Phenoxy acid herbicides rapidly disappear with no detectable residues at harvest time. None of the studied herbicides are detected in the barley samples.

Among the years 2002-2004, a wide soil monitoring is carried out in agricultural properties in order to implement the Program of Cerealian Steppes. Chlortoluron, Isoproturon, Diflufenican, Terbutryn and Triallate residues are found, being their values above the proposed limit of determination for herbicides in soils, i.e. 0.05 mg/kg.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción: Justificación del estudio	3
1.1.1. Plaguicidas.....	3
1.1.1.1. Definición.....	3
1.1.1.2. Desarrollo Histórico.....	3
1.1.1.3. Importancia Económica en la Agricultura.....	4
1.1.1.4. Problemática derivada de su uso.....	5
1.1.1.5. Residuos.....	6
1.1.2. Impacto en la Salud.....	6
1.1.2.1. Toxicología.....	7
1.1.2.2. Seguridad Alimentaria.....	8
1.1.3. Impacto Medioambiental.....	8
1.1.3.1. Evolución en el Medio ambiente.....	8
1.1.3.2. Ecotoxicología: Estudios de Riesgo Ambiental.....	9
1.1.4. Legislación.....	10
1.1.4.1. Límites Máximos de Residuos.....	11
1.1.4.2. Homologación.....	13
1.1.4.3. Programas de Vigilancia.....	15
1.1.4.4. Métodos de Análisis.....	16
1.1.5. Cultivo y Plaguicidas escogidos.....	17
1.1.5.1. Cebada (<i>Hordeum Vulgare</i>).....	17
1.1.5.2. Malas Hierbas y Herbicidas. Importancia económica en la Agricultura.....	19
1.1.5.3. Contaminación del Suelo: Estudios en Campo.....	20
1.1.5.4. Contaminación del Cultivo: Análisis de Residuos.....	22
1.1.5.5. Impacto provocado por la Agricultura. Ayudas Agroambientales...	22
1.2. Hipótesis	24
1.3. Objetivos	25
1.4. Bibliografía	26
CAPÍTULO 2	
DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS MULTIRRESIDUO DE HERBICIDAS	29
2.1. Introducción	32
2.1.1. Técnicas de Análisis de Residuos de Herbicidas.....	32
2.1.1.1. Técnicas Cromatográficas.....	32
2.1.1.2. Otras Técnicas.....	36
2.1.2. Analitos.....	37
2.1.2.1. Grupo I: Directamente analizables por GC.....	40
2.1.2.2. Grupo II: Termolábiles. Análisis por GC de sus Productos de Degradación Térmica.....	41
2.1.2.3. Grupo III: Polares. Análisis por GC previa Derivatización.....	43
2.1.3. Métodos de Optimización.....	45

2.1.4. Evaluación del Efecto Matriz	46
2.1.5. Objetivos.....	48
2.2. Material y Métodos.....	49
2.2.1. Reactivos	49
2.2.2. Analitos.....	49
2.2.3. Material de Laboratorio	49
2.2.4. Equipos	50
2.2.4.1. HPLC-DAD	50
2.2.4.2. GC-AED	50
2.2.4.3. GC-MS	51
2.2.4.4. PTV-GC-TOF/MS	52
2.2.4.5. LC-(ESI)-MS/MS	53
2.2.5. Optimización de la Derivatización del Grupo III	54
2.2.6. Estudio del Efecto Matriz.....	56
2.2.6.1. Test t de igualdad de las pendientes	56
2.2.6.2. Solapamiento de los intervalos de confianza de las pendientes.....	58
2.2.6.3. Ajuste de ambos calibrados a una línea.....	59
2.3. Resultados y Discusión	60
2.3.1. HPLC-DAD	60
2.3.1.1. Optimización de la Fase Móvil.....	60
2.3.1.2. Detección.....	60
2.3.2. GC-AED	61
2.3.2.1. Optimización del programa de Temperaturas	61
2.3.2.2. Detección.....	61
2.3.2.3. Validación.....	62
2.3.3. GC-MS	64
2.3.3.1. Optimización de la Inyección	64
2.3.3.2. Optimización del programa de Temperaturas	64
2.3.3.3. Detección.....	65
2.3.3.4. Optimización de la Derivatización del Grupo III	67
2.3.3.5. Adición de Modificadores	73
2.3.3.6. Validación.....	74
2.3.4. PTV-GC-TOF/MS	76
2.3.4.1. Optimización de la Inyección	76
2.3.4.2. Optimización del programa de Temperaturas	76
2.3.4.3. Detección.....	76
2.3.4.4. Validación.....	76
2.3.5. LC-(ESI)-MS/MS	77
2.3.5.1. Optimización de la Fase Móvil.....	78
2.3.5.2. Detección.....	79
2.3.5.3. Validación.....	80
2.3.6. Comparación de las diferentes técnicas de análisis.....	81
2.3.7. Estudio del Efecto Matriz.....	82
2.4. Conclusiones.....	84
2.5. Bibliografía.....	86

CAPÍTULO 3	
OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN MULTIRRESIDUO DE HERBICIDAS EN MUESTRAS DE SUELO	91
3.1. Introducción	93
3.1.1. Interacción Suelo:Herbicidas	93
3.1.1.1. Características de los Suelos	93
3.1.1.2. Características de los Herbicidas	95
3.1.2. Técnicas de Extracción de Residuos de Herbicidas en Suelo	96
3.1.3. Métodos de Extracción de Residuos de Herbicidas en Suelo	98
3.1.4. Limpieza de Muestras de Suelo	100
3.1.5. Objetivos	103
3.2. Material y Métodos	104
3.2.1. Reactivos	104
3.2.2. Analitos	104
3.2.3. Material de Laboratorio	105
3.2.4. Muestras de Suelo	105
3.2.5. Concentración del Extracto	106
3.2.6. Extracción	107
3.2.6.1. Experimentos Previos	107
3.2.6.2. Diseño Ortogonal	110
3.2.7. Limpieza de Muestra	110
3.2.7.1. Extracción en Fase Sólida (SPE)	110
3.2.7.2. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (dSPE)	111
3.2.8. Análisis	112
3.3. Resultados y Discusión	113
3.3.1. Concentración del Extracto	113
3.3.2. Extracción	114
3.3.2.1. Experimentos Previos	114
3.3.2.2. Diseño Ortogonal	119
3.3.3. Limpieza de Muestra	123
3.3.3.1. Extracción en Fase Sólida (SPE)	123
3.3.3.2. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (dSPE)	125
3.3.4. Validación de los métodos de análisis de residuos	128
3.3.4.1. Especificidad/Selectividad	129
3.3.4.2. Linealidad	129
3.3.4.3. Límites de Detección y Cuantificación	129
3.3.4.4. Efecto Matriz	132
3.3.4.5. Exactitud (Recuperación) y Precisión	132
3.3.4.6. Robustez	135
3.3.4.7. Incertidumbre	138
3.4. Conclusiones	140
3.5. Bibliografía	142

CAPÍTULO 4	
COMPARACIÓN DE EXTRACCIONES MULTIRRESIDUO DE HERBICIDAS EN MUESTRAS DE CEBADA	147
4.1. Introducción	149
4.1.1. Interacción Planta:Herbicidas	149
4.1.2. Técnicas de Extracción de Residuos de Herbicidas en Material Vegetal.....	150
4.1.3. Métodos de Extracción de Residuos de Herbicidas en Material Vegetal.....	150
4.1.3.1. Principales Métodos Oficiales	150
4.1.3.2. <i>QuEChERS</i>	153
4.1.4. Limpieza de Muestras de Material Vegetal	154
4.1.5. Objetivos.....	155
4.2. Material y Métodos	156
4.2.1. Analitos.....	156
4.2.2. Material de Laboratorio	156
4.2.3. Muestras de Cebada.....	157
4.2.4. Extracciones en el RIKILT	158
4.2.4.1. <i>QuEChERS</i>	159
4.2.4.2. Método del Acetato de Etilo	159
4.2.4.3. Método mini Luke	159
4.2.4.4. Método de la Acetona.....	161
4.2.5. Adaptación de los Métodos en el ITACyL.....	161
4.2.5.1. <i>Buffered QuEChERS</i>	162
4.2.5.2. Extracción de Residuos de Herbicidas en Muestras de Paja	162
4.2.6. Análisis	164
4.3. Resultados y Discusión	165
4.3.1. Extracciones en el RIKILT	165
4.3.1.1. <i>QuEChERS</i>	165
4.3.1.2. Comparación de Métodos.....	167
4.3.1.3. Evaluación del Efecto Matriz	168
4.3.2. Adaptación de Métodos en el ITACyL.....	171
4.3.2.1. Comparación de Métodos.....	171
4.3.2.2. Diferencias entre la Extracción de Residuos de Herbicidas en Muestras de Grano y Muestras de Paja	176
4.3.2.3. <i>QuEChERS - Buffered QuEChERS</i>	179
4.3.3. Validación.....	182
4.3.3.1. Especificidad/Selectividad.....	182
4.3.3.2. Linealidad	182
4.3.3.3. Límites de Detección y Cuantificación	182
4.3.3.4. Exactitud (Recuperación) y Precisión	185
4.3.3.5. Incertidumbre	188
4.4. Conclusiones	190
4.5. Bibliografía	193

CAPÍTULO 5	
ENSAYOS DE DISIPACIÓN DE HERBICIDAS EN CAMPO	197
5.1. Introducción	199
5.1.1. Persistencia y Disipación	199
5.1.2. Mecanismos de Disipación	199
5.1.2.1. Procesos de Degradación	200
5.1.2.2. Procesos de Transporte	201
5.1.2.3. Procesos de Acumulación	202
5.1.3. Factores que regulan la Disipación de los Herbicidas en el Suelo	203
5.1.3.1. Propiedades del Herbicida	203
5.1.3.2. Características del Suelo	206
5.1.3.3. Influencia del Medio y de las Prácticas Agronómicas	207
5.1.4. Ensayos de Disipación	208
5.1.4.1. Tipos de Ensayos	208
5.1.4.2. Legislación sobre Ensayos	209
5.1.5. Cinéticas de Disipación	210
5.1.5.1. Tipos de Cinéticas	210
5.1.5.2. Cálculo de DT_{50} y DT_{90}	212
5.1.6. Objetivos	214
5.2. Material y Métodos	215
5.2.1. Diseño de los Ensayos en Campo	215
5.2.1.1. Parcela	215
5.2.1.2. Selección de Herbicidas	217
5.2.2. Tratamientos	219
5.2.3. Muestras de Suelo	221
5.2.3.1. Diseño del Muestreo	221
5.2.3.2. Pretratamiento y Extracción de Residuos en Suelo	223
5.2.3.3. Cálculo de la Cantidad Inicial de Herbicida en el Suelo	224
5.2.3.4. Cálculo de las Cinéticas de Disipación y DT_{50} - DT_{90}	225
5.2.4. Muestras de Cebada	227
5.2.4.1. Diseño del Muestreo	227
5.2.4.2. Pretratamiento y Extracción de Residuos en Cebada	228
5.3. Resultados y Discusión	229
5.3.1. Cinéticas de disipación y DT_{50} - DT_{90} en Suelo	229
5.3.1.1. 1 ^{er} Ensayo: 2002-2003 y 2 ^{do} Ensayo: 2003-2004	232
5.3.1.2. 3 ^{er} Ensayo: 2004-2005	255
5.3.2. Residuos en Cebada	273
5.4. Conclusiones	274
5.5. Bibliografía	277
CAPÍTULO 6	
PROGRAMA DE LAS ESTEPAS CEREALISTAS. PROTECCIÓN DEL HÁBITAT DE LA AVUTARDA	283
6.1. Introducción	285
6.1.1. Impacto Medioambiental de la Agricultura	285

6.1.1.1. Agricultura y Biodiversidad	285
6.1.1.2. Estepas Cerealistas	285
6.1.2. La Avutarda	287
6.1.2.1. Descripción	287
6.1.2.2. Distribución	289
6.1.2.3. Amenazas	291
6.1.3. Medidas de Protección.....	293
6.1.3.1. Política Agrícola Común	293
6.1.3.2. Programa de las Estepas Cerealistas en Castilla y León	295
6.1.4. Objetivos.....	296
6.2. Material y Métodos.....	297
6.3. Resultados y Discusión	298
6.4. Conclusiones.....	305
6.5. Bibliografía.....	306
CONCLUSIONES GENERALES	309
ANEXO.....	315
Publicaciones y Contribuciones a Congresos.....	316

CAPÍTULO 1:
INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS

ÍNDICE

1.1. Introducción: Justificación del estudio	3
1.1.1. Plaguicidas.....	3
1.1.1.1. Definición	3
1.1.1.2. Desarrollo Histórico	3
1.1.1.3. Importancia Económica en la Agricultura.....	4
1.1.1.4. Problemática derivada de su uso	5
1.1.1.5. Residuos	6
1.1.2. Impacto en la Salud	6
1.1.2.1. Toxicología.....	7
1.1.2.2. Seguridad Alimentaria.....	8
1.1.3. Impacto Medioambiental.....	8
1.1.3.1. Evolución en el Medio ambiente.....	8
1.1.3.2. Ecotoxicología: Estudios de Riesgo Ambiental	9
1.1.4. Legislación	10
1.1.4.1. Límites Máximos de Residuos	11
1.1.4.2. Homologación	13
1.1.4.3. Programas de Vigilancia.....	15
1.1.4.4. Métodos de Análisis	16
1.1.5. Cultivo y Plaguicidas escogidos.....	17
1.1.5.1. Cebada (<i>Hordeum Vulgare</i>).....	17
1.1.5.2. Malas Hierbas y Herbicidas. Importancia económica en la Agricultura.....	19
1.1.5.3. Contaminación del Suelo: Estudios en Campo	20
1.1.5.4. Contaminación del Cultivo: Análisis de Residuos	22
1.1.5.5. Impacto provocado por la Agricultura. Ayudas Agroambientales...	22
1.2. Hipótesis	24
1.3. Objetivos	25
1.4. Bibliografía	26

1.1. INTRODUCCIÓN: JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

1.1.1. PLAGUICIDAS

1.1.1.1. Definición

Según el Real Decreto (RD) 3349/1983, de 8 de febrero, de la Reglamentación Técnico Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de Plaguicidas, modificado por el RD 162/1991, de 8 de febrero, son plaguicidas, las sustancias o ingredientes activos, así como sus formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a cualquiera de los fines siguientes:

- ✓ Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción.
- ✓ Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.
- ✓ Conservar los productos vegetales, incluida la protección de las maderas.
- ✓ Destruir los vegetales indeseables.
- ✓ Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.

Los plaguicidas pueden, a su vez, clasificarse en:

- Insecticidas: Tóxicos para insectos.
- Acaricidas: Tóxicos para ácaros.
- Nematocidas: Tóxicos para los nemátodos.
- Fungicidas: Tóxicos para hongos.
- Antibióticos: Inhiben el crecimiento de microorganismos.
- Rodenticidas: Causan la muerte a ratones y otros roedores.
- Avicidas: Causan la muerte a las aves.
- Molusquicidas: Eliminan los moluscos.
- Atrayentes y repelentes de insectos: Repelen a los insectos o los atraen para provocar su destrucción.
- Herbicidas: Atacan las malas hierbas. Son productos químicos que puestos en contacto con las plantas, le producen la muerte o alteraciones que evitan su crecimiento normal y producen deformaciones que desembocan en su muerte.

Los plaguicidas usados en agricultura se denominan normalmente productos fitosanitarios. La materia activa de un plaguicida es un compuesto obtenido normalmente por síntesis y que está formulado en partículas sólidas o en forma de líquidos concentrados. Estas formulaciones comerciales de los plaguicidas se diluyen en agua antes de su aplicación agrícola en las dosis recomendadas. Las formulaciones plaguicidas generalmente contienen también otros compuestos que mejoran la eficacia de la aplicación.

1.1.1.2. Desarrollo Histórico

Desde el nacimiento de la agricultura, la humanidad ha luchado constantemente con plagas y malas hierbas para incrementar el rendimiento de los cultivos y proporcionar una fuente adecuada de alimentos. La idea de usar compuestos químicos se remonta hasta las antiguas Grecia y Roma, donde la quema de azufre se usaba para ahuyentar enfermedades.

Sin embargo no fue hasta el siglo XX, cuando comenzó la fabricación y producción en masa de plaguicidas orgánicos sintéticos, convirtiéndose en parte integral de la agricultura moderna. El descubrimiento de las propiedades herbicidas del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en 1945, puede considerarse como el inicio del uso de herbicidas orgánicos en la agricultura.

Desde entonces más de 130 materias activas se han sintetizado con este fin. Ha habido una tendencia general durante los pasados 30 ó 40 años hacia la introducción de productos con dosis más bajas de aplicación, menor persistencia medioambiental, y menor toxicidad debido a mayores tasas de degradación [1].

1.1.1.3. Importancia Económica en la Agricultura

Según datos de la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO), dos tercios de la Humanidad están subalimentados, lo que implica que el aumento de la producción agrícola es una necesidad primordial. La producción primaria (vegetal y animal) tiene una importancia considerable en la alimentación, pero el rendimiento de dicha producción se ve constantemente afectado por organismos y plantas dañinos de cuyos efectos es absolutamente necesario proteger las plantas, los productos vegetales y el ganado, no solamente para evitar una reducción de la producción sino también para aumentar la productividad agrícola [2].

La Agricultura es con diferencia el mayor sector en uso de plaguicidas del que, además, depende fuertemente para asegurar rendimientos aceptables. Debido a los beneficios directos de su uso, los plaguicidas se emplean a gran escala y generalmente se consideran fundamentales en los modernos sistemas de cultivo.

La Unión Europea (UE) ocupa la cuarta parte del mercado mundial de plaguicidas, con 32.000 toneladas de sustancias activas vendidas al año. Los fungicidas son los productos más usados (43% del mercado), seguidos de los herbicidas (36%), insecticidas (12%) y otros (9%) [3]. A pesar de la legislación vigente y de las políticas aplicadas destinadas a proteger la salud humana y el medio ambiente, el consumo y el uso reales de productos fitosanitarios en la UE no ha bajado entre 1992 y 2003, como se deduce de la Figura 1.1.

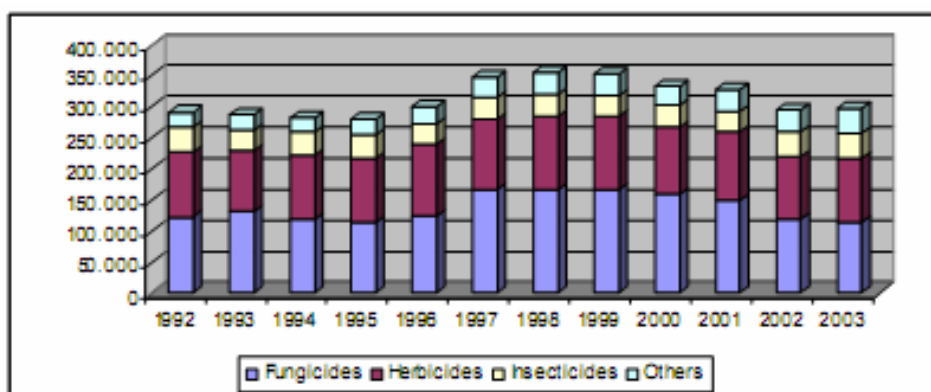


Figura 1.1. Ventas de sustancias activas de productos fitosanitarios en la UE (en toneladas). Datos de ECPA (European Crop Protection Association).

En España, por su parte, los productos fitosanitarios suponen el 24% de los *inputs* utilizados en la agricultura española, con un gasto anual del orden de 950 millones de euros (Tabla 1.1) [4].

Tabla 1.1. Consumo de productos fitosanitarios en España en 2002 en millones de euros [4].

Grupos de productos	Consumo	Cuota	Cuota UE
Insecticidas (1)	304,29	31,6%	17,3%
Fungicidas	229,95	23,8%	38,0%
Herbicidas	330,11	34,2%	39,6%
Varios	99,80	10,4%	5,1%

(1) Incluye acaricidas y nematocidas.

Ni el sector agrícola ni la economía de un país podrían soportar la supresión de tratamientos fitosanitarios que evitasen importantes pérdidas sin alternativas viables suficientemente eficaces. Un estudio económico del año 1995 [5], estimó que la completa eliminación del uso de plaguicidas en los cultivos de frutas y verduras en los Estados Unidos (EEUU), incrementaría un 45% los precios, reduciría la producción un 16%, la exportación un 27%, y necesitaría un 44% más de superficie de cultivos para obtener rendimientos similares.

1.1.1.4. Problemática derivada de su uso

Los beneficios inmediatos del uso de plaguicidas no deben hacer olvidar algunos problemas medioambientales y sanitarios derivados de su empleo. Aunque han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados, entre ellos, la generación de organismos resistentes, la contaminación de recursos hídricos con la consiguiente degradación de la flora y fauna, y en especial la incidencia de sus residuos sobre el propio suelo de cultivo, su entorno y la planta.

Sus riesgos revisten un triple aspecto [6]:

- ✓ para el Aplicador, por su toxicidad directa vía digestiva, respiratoria o dérmica,
- ✓ para el Medio ambiente, por su posible acción sobre la fauna, la contaminación, etc.
- ✓ para el Consumidor, por el problema de los residuos que dejan en los alimentos.

En medio siglo de producción, la industria química mundial ha generado una elevada cantidad de estos compuestos que se han difundido por todo el planeta, contaminando prácticamente a todos los seres vivos hasta en las tierras más remotas. Probablemente, la consecuencia de mayor alcance derivada de su uso, es su contribución a la contaminación y degradación del medio ambiente debido a su acumulación en los ecosistemas acuático y terrestre pasando, a través de la cadena alimentaria a las especies animales y, por último, al hombre.

A pesar de las mejoras en las normas sobre medio ambiente, es cada vez más probable la existencia de un vínculo entre la degradación ambiental y ciertas enfermedades humanas. Esto ha llevado a un control y una legislación más estrictos, no sólo en los alimentos, sino también en el agua, el suelo e incluso el aire. En este sentido, la Decisión 1600/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2002, por la que se establece el VI Programa de acción comunitario en materia de medio ambiente, apuesta por una “Estrategia Temática en el Uso Sostenible de los Plaguicidas” donde señala la necesidad de animar a los agricultores para que utilicen de

forma diferente los productos fitosanitarios con el objetivo de reducir al mínimo sus repercusiones negativas sobre la salud humana y el medio ambiente, garantizando al mismo tiempo la protección necesaria de los cultivos. Entre sus principales objetivos destacan, la actuación sobre la salud y la calidad de vida, y en los ámbitos del medio ambiente y la biodiversidad.

1.1.1.5. Residuos

Sin duda, cada vez es mayor la inquietud de la sociedad por la calidad toxicológica de los alimentos y más concretamente por los niveles de residuos de compuestos tóxicos en los mismos. Los residuos de plaguicidas afectan tanto a la economía como a la salud pública, ya que su presencia, además de constituir una barrera que limita la comercialización de productos en los mercados internacionales, constituye un riesgo para la salud de los consumidores. Así, el tema se ha convertido en uno de los problemas ambientales y sanitarios que más interés despierta entre los consumidores de todo el mundo, lo que ha hecho que actualmente sean los contaminantes orgánicos que reciben el mayor esfuerzo investigador en todos los campos.

Se han dado definiciones distintas, incluso a nivel legislativo, de lo que se considera como Residuo de un Plaguicida:

- ✓ En el Codex Alimentario (Comisión conjunta de la FAO y la Organización Mundial de la Salud, OMS); es toda sustancia o sustancias presentes en un producto alimenticio destinado al hombre o a los animales como consecuencia de la utilización de un plaguicida.
- ✓ En la Directiva Europea 91/414/EEC del Consejo, de 15 de Julio de 1991, sobre la puesta en el mercado de los productos de protección de plantas; es una o varias sustancias que se encuentran en los vegetales o productos de origen vegetal, productos comestibles de origen animal, o componentes del medio ambiente, y que constituyen los restos de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción.
- ✓ En el RD 3349/1983, de 30 de noviembre, sobre la Reglamentación Técnico - Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas; son los restos de plaguicidas y los eventuales productos tóxicos de su metabolización o degradación, que se presenten en o sobre los alimentos destinados al hombre o al ganado.

La expresión cuantitativa de los residuos, se hace en proporción en peso, es decir, en miligramos de residuo por kilogramo de producto vegetal o animal (mg/kg).

1.1.2. IMPACTO EN LA SALUD

Cuando se aplica un plaguicida se produce un depósito en la planta que es eliminado progresivamente, con mayor o menor rapidez, en función de factores tales como la tasa de crecimiento del vegetal, las condiciones ambientales, las propiedades físico-químicas del plaguicida y los procesos de degradación que sufre. Los residuos de plaguicidas persistentes diluidos en el medio ambiente, ven favorecida su incorporación a las cadenas tróficas a través de las plantas, y su biomagnificación ya que se acumulan en los tejidos grasos humanos y animales.

La Actuación sobre la Salud y la Calidad de Vida dentro del VI Programa de acción comunitario en materia de medio ambiente, tiene como objetivos la reducción del impacto de los plaguicidas en la salud humana, y su uso más sostenible, así como una importante reducción global de su utilización y de sus riesgos. Los plaguicidas

utilizados de carácter persistente, bioacumulativo, tóxico o con otras propiedades que planteen preocupaciones, deberán ser sustituidos por otros menos peligrosos, así como, ser vigilados y evaluados los riesgos que suponen su utilización, su recuperación y su eliminación.

Casi todas las personas en los países desarrollados tomamos residuos de plaguicidas en los alimentos que ingerimos [6]. Sin embargo, para poder estimar el riesgo real que estos residuos suponen para la salud humana, es necesario poseer una serie de conocimientos sobre los factores que determinan dicho riesgo, básicamente:

- ✓ Datos completos sobre la **Toxicología** de la materia activa, sus metabolitos, inertes, coadyuvantes, etc.
- ✓ Contenidos reales en **Residuos de los productos alimenticios** y proporción en la que los distintos alimentos tratados entran en la dieta alimenticia, para así conocer el nivel de exposición.

1.1.2.1. Toxicología

Por toxicidad se entiende la cualidad que tiene una sustancia o sus metabolitos, en ciertas dosis, de ocasionar un perjuicio a la salud por acciones químicas o físico-químicas [6].

La mayoría de los plaguicidas son tóxicos en mayor o menor grado. Algunos pueden causar diversos cánceres, y muchos son disruptores endocrinos, una clase de compuestos químicos que interfiere con los procesos hormonales en humanos y animales. Según datos de la OMS, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas.

Los efectos indeseados producidos dependen del plaguicida, la dosis, la vía de entrada y el tiempo de exposición. Los efectos agudos (vómitos, diarrea, aborto, cefalea, somnolencia, alteraciones comportamentales, convulsiones, coma, muerte) están asociados a accidentes donde una única dosis alta es suficiente para provocar los efectos que se manifiestan tempranamente. Los crónicos (cánceres, leucemia, necrosis de hígado, malformaciones congénitas, neuropatías periféricas, malestar general, cefaleas persistentes, dolores vagos, efectos sobre el aparato respiratorio y nervioso) se deben a exposiciones repetidas que generan un depósito o efectos acumulativos en el organismo, y sus síntomas aparecen después de un largo tiempo de contacto con el plaguicida, dificultando su detección. Dado que su biotransformación es muy lenta, los plaguicidas provocan efectos acumulativos en las personas expuestas [7]. La toxicidad aguda puede determinarse a través de experimentos toxicológicos y la epidemiología puede, a veces, encontrar correlaciones entre algunas causas y los efectos que provocan, pero no es fácil cuando se trata de efectos crónicos a largo plazo. Puede que nunca se pueda determinar el riesgo real de los residuos de plaguicidas en los alimentos debido al gran número de variables involucradas y a los niveles tan bajos en que se encuentran [8].

Los plaguicidas deben pasar una serie de estudios toxicológicos para averiguar si son peligrosos para fabricantes, técnicos, agricultores, consumidores, etc. En estos, se somete a diversos animales de laboratorio a la acción del producto, para tratar de averiguar su toxicidad aguda (la debida al efecto de una sola dosis), bien sea oral, dérmica o por inhalación. La expresión cuantitativa de la toxicidad se representa mediante la dosis letal media (DL_{50}) que corresponde a la cantidad de plaguicida necesario para causar la muerte al 50% de los individuos que constituyen el lote del ensayo [2]. Otro parámetro que se utiliza es el nivel sin efecto, NEL (*non effect level*) ó NOEL (*non observed effect level*).

El problema estriba en que las extrapolaciones a partir de estos estudios de laboratorio con dosis relativamente altas para conocer el impacto producido por dosis mucho menores en el medio ambiente o en los alimentos, supone una tarea casi imposible [9]. De hecho, la mayoría de los estudios epidemiológicos diseñados para determinar si los plaguicidas en el medio ambiente están produciendo algún efecto crónico o agudo en los humanos, han sido ambiguos y poco concluyentes. Además faltan datos suficientes sobre niveles de residuos en alimentos, así como de dietas según edad, sexo, zonas geográficas... y se desconocen los mecanismos por los que estas sustancias químicas pueden inducir el cáncer [6].

Los preparados y demás productos utilizados como plaguicidas se clasifican, en lo que se refiere a su toxicidad aguda, de acuerdo a los criterios de clasificación especificados por la FAO y la OMS [10].

1.1.2.2. Seguridad Alimentaria

La seguridad alimentaria y la protección de los intereses de los consumidores preocupan cada vez más al público en general, lo que ha provocado que en los últimos años se esté produciendo un cambio con el objetivo de mejorar la calidad de los productos. Tanto la industria como la distribución, deben asegurar la calidad de los productos que ponen en el mercado. Es lo que se conoce como seguridad alimentaria, directamente relacionada con la seguridad de productos y con la protección del consumidor.

Puesto que la legislación alimentaria autoriza el uso de plaguicidas, que pueden entrañar riesgos para el medio ambiente o para la seguridad de los consumidores, las autoridades también deben evaluar con arreglo a la normativa pertinente algunos aspectos relacionados con la protección de la salud [2]. De conformidad con la Directiva 91/414/CEE, y debido a que la salud pública prima sobre el interés de la protección fitosanitaria, es necesario velar porque los residuos resultantes de los tratamientos con plaguicidas, no estén presentes en niveles que supongan un riesgo inaceptable para los seres humanos y, en su caso, para los animales. Así se establece que los Estados miembros, al conceder una autorización para los productos fitosanitarios, deben exigir que se utilicen adecuadamente y se controlen sus residuos.

1.1.3. IMPACTO MEDIOAMBIENTAL

El impacto ambiental se puede definir como el efecto, durante un determinado tiempo y en un espacio definido, de una actividad humana sobre un parte del medio ambiente, en comparación a la situación si esa actividad no se hubiese realizado [11].

1.1.3.1. Evolución en el Medio ambiente

La relación causa-efecto entre la aplicación puntual de plaguicidas en áreas agrícolas y la observación de contaminación por los mismos en el medio circundante es, generalmente, difícil de establecer. El principal problema es el desconocimiento de los procesos que afectan al comportamiento y destino final de los plaguicidas desde el momento en que entran en el medio hasta que alcanzan su objetivo. Posteriormente a la aplicación de plaguicidas se desencadenan procesos complejos que definen el destino de los mismos en el ambiente. Pueden seguir diversos caminos: atmósfera, suelo y agua, pasando por los alimentos, y pudiendo intercambiarse de un sistema a otro formando un ciclo. La distribución inicial del plaguicida depende del método, la cantidad, la frecuencia y el sitio de aplicación, así como de la topografía del terreno, el tipo y densidad de vegetación, las condiciones del suelo y la proximidad de fuentes de agua.

Los plaguicidas una vez liberados en el medio ambiente, pueden degradarse por la acción del sol, el agua, otros compuestos químicos o los microorganismos. Esta degradación da lugar a productos que pueden ser más o menos tóxicos que los de origen. Otra posibilidad es que el plaguicida sea muy resistente a la degradación y permanezca inalterado en el medio ambiente. Desde el punto de vista agronómico es conveniente que los herbicidas persistan lo suficiente como para poder controlar las malas hierbas en todo el ciclo del cultivo, si bien no debieran persistir excesivamente como para dañar el cultivo que sigue a la rotación o constituir un problema, puesto que podrían moverse largas distancias y acumularse provocando efectos adversos.

Se pueden diferenciar cuatro estados con características específicas en el destino de los plaguicidas en el medio ambiente [9]:

- ✓ **Entrada al medio**, en el que tienen especial influencia las propiedades del plaguicida, el modo de aplicación y los factores climáticos;
- ✓ **Procesos en el medio**, que incluyen transformación, retención y transporte;
- ✓ **Destino final**, en función de los resultados de los procesos anteriores;
- ✓ **Impacto**, tanto en lo que se refiere a su eficacia como a su afección al medio ambiente.

Los mecanismos que rigen la evolución de los plaguicidas en el medio ambiente pueden dividirse en procesos de transporte, retención y degradación o transformación, representados en la Figura 1.2.

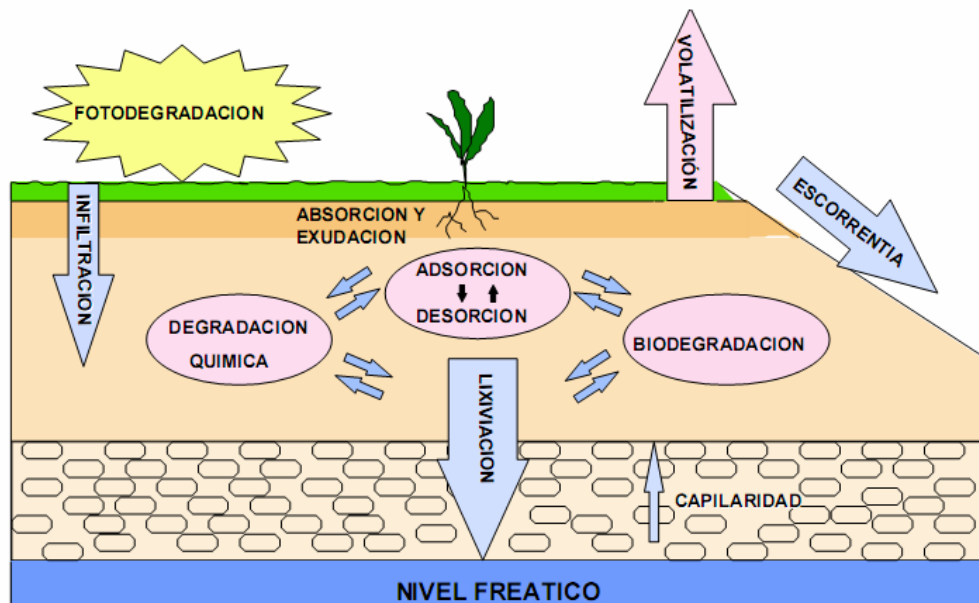


Figura 1.2. Esquema de los procesos que afectan a los plaguicidas en el medio ambiente.

1.1.3.2. Ecotoxicología: Estudios de Riesgo Ambiental

Comparada con la toxicidad humana, el daño para las especies medioambientales pasa normalmente a un segundo plano [9]. Este proceso de degradación de la vida biológica en el medio terrestre es consecuencia de la intensificación del sistema de producción

que ha sido durante mucho tiempo la regla en la agricultura. Así, los productos fitosanitarios llegan al suelo y afectan a las bacterias, los hongos, los gusanos de tierra y los insectos, lo que tiene un efecto nocivo en la fertilidad del mismo.

Las muertes de mamíferos imputables a los plaguicidas son generalmente consecuencia de la ingestión de comida contaminada. Los carnívoros acumulan normalmente más cantidad de residuos que los herbívoros. En cuanto a los pájaros, se han documentado numerosas muertes tras la ingestión directa de semillas o insectos infectados por fitosanitarios [13].

A pesar de que la mayor parte de los tratamientos son aplicados sobre las partes aéreas de las plantas, una buena cantidad de producto llega al suelo. Durante las épocas lluviosas, los plaguicidas presentes sobre las plantas o adsorbidos en las partículas del suelo, pueden llegar a los sistemas acuáticos por medio de fenómenos de lixiviación y como consecuencia, implicar una contaminación en las aguas de las capas freáticas. Las propiedades fitotóxicas de los plaguicidas pueden igualmente destruir el plancton y romper así la cadena trófica.

El seguimiento de los residuos de plaguicidas para saber cuánto persisten en el cultivo, suelo, acuíferos, etc. es muy importante y requiere un análisis concienzudo teniendo en cuenta las interacciones entre los compartimentos del medio ambiente [14].

En la etiqueta de todo producto plaguicida aparece una clasificación toxicológica en función de su potencial tóxico para los humanos y otros animales y organismos, según las clasificaciones establecidas por el RD 3349/83. Se expresa mediante 4 letras, la primera expresa la peligrosidad para el hombre y los animales domésticos, la segunda para la fauna terrestre, la tercera para la fauna acuícola y la última para la fauna apícola:

1. Peligrosidad para el hombre y animales domésticos: La peligrosidad de un producto aumenta según las series: Baja (sin símbolo), Irritante (Xi), Nocivo (Xi), Tóxico (T), Muy Tóxico (T+). Si el producto fuera explosivo o inflamable aparecerían las letras E o F.
2. Peligrosidad para la Fauna Terrestre, Acuícola y Apícola, aparecen las letras A, B o C, que indican un grado creciente de peligrosidad.
3. Categoría A: productos inocuos, es decir, su utilización adecuada no entraña riesgos.
4. Categoría B: productos medianamente peligrosos cuyo empleo con carácter masivo o en aplicaciones repetidas o inadecuadas, puede entrañar riesgo.
5. Categoría C: productos peligrosos cuya autorización debe estar registrada a aplicaciones en determinados cultivos y cumpliendo condiciones estrictas.

1.1.4. LEGISLACIÓN

Debido a la peligrosidad que pueden presentar los residuos de plaguicidas, las autoridades de la mayor parte de países han dictado normas con las que se pretende hacer compatible la protección de la salud de los consumidores con la defensa de los cultivos contra plagas y enfermedades.

La legislación asegura que los agricultores sólo podrán utilizar productos que cumplan los requisitos estrictos relativos a la efectividad y la seguridad para el ser humano y el medio ambiente, siguiendo las buenas prácticas agrícolas, de conformidad con las condiciones establecidas en la autorización que se emite para cada producto.

Las normativas desarrolladas contemplan los diferentes aspectos de peligrosidad presumibles para este tipo de productos, comprendiendo los aspectos iniciales y finales del ciclo de vida de los plaguicidas, es decir, desde el control de la comercialización y el uso de productos fitosanitarios, hasta los posibles riesgos por exposición directa del usuario, por vía alimentaria para el consumidor, para los animales domésticos, para el medio ambiente y para la fauna y flora silvestres, incluidos la entomofauna y los microorganismos no patógenos, con objeto de garantizar que estos productos no constituyan un peligro [4]. De entre estas normativas, las más importantes tratan sobre:

1. la fijación de **Límites Máximos de Residuos**,
2. la obligación de **Homologación y Registro**,
3. el **Control** mediante **Programas de Vigilancia** del uso de ciertos plaguicidas, pasando por diversos tipos de restricciones y limitaciones de uso.

1.1.4.1. Límites Máximos de Residuos

Aunque el uso de algunos plaguicidas esté totalmente prohibido y el de otros restringido debido a su elevada toxicidad, persistencia o efectos acumulativos, el resto de los plaguicidas, cuyo empleo está autorizado, tiene fijado un Límite Máximo de Residuo (LMR) en los cultivos y alimentos tratados con estos productos.

El LMR es la concentración máxima permitida de un residuo, en o sobre un alimento, que puede aceptarse legalmente para el consumo humano o animal a largo plazo. Se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso del alimento fresco (mg/kg). Es un concepto legal y no constituye un límite de seguridad, ya que sólo representa residuos aceptables desde el punto de vista toxicológico. Normalmente se fijan muy por debajo de los límites de seguridad para que la exposición a residuos por encima de los LMR no implique automáticamente un riesgo para la salud.

Para la fijación de los LMR se tienen en cuenta dos criterios básicos: uno toxicológico y otro agronómico. Por una parte, la ingestión diaria de residuos ha de ser tal que no provoque efectos nocivos, fijada a partir del NEL ó NOEL de la sustancia en cuestión, establecido sobre animales en experimentación; y de la Ingestión Diaria Admisible (IDA) de cada materia activa para el hombre. Y por otra, el plaguicida ha de lograr una eficacia adecuada sobre la plaga a combatir utilizando la menor cantidad posible, fijada a través de ensayos de campo para conocer el residuo real que queda en los alimentos cuando son tratados siguiendo las buenas prácticas agrícolas. Además, para evitar la presencia de un residuo superior al tolerable, se determinan también los tiempos mínimos que deben transcurrir entre la aplicación del plaguicida y la recolección de la cosecha [12].

La existencia de legislación que fije LMR de productos fitosanitarios en productos de origen vegetal es una cuestión de gran importancia a escala mundial para poder suprimir barreras que impiden el comercio de productos vegetales, garantizando la inexistencia de efectos nocivos en los consumidores.

En Europa, históricamente cada país comenzó a legislar según sus propios criterios, pero la diversidad legislativa entre países provocaba problemas para el libre tránsito de mercancías entre unos países y otros, y suponía una barrera técnica al libre comercio. Los países de la UE iniciaron intentos armonizadores con la Directiva 76/895/CEE, en la que se determinaban los LMR de ciertos plaguicidas en/sobre frutas y hortalizas [6].

En 1979, la Directiva 79/100/CEE estableció los métodos comunitarios de toma de muestras de frutas y hortalizas. Ésta fue seguida por la Directiva 86/362/CEE, cuyo

ámbito de aplicación fueron los cereales. Sin embargo la consecución del mercado único estaba en peligro puesto que hasta ese momento se establecían LMR mínimos que los Estados podían modificar. La Directiva 90/642/CEE intentó solucionar este problema, abarcando frutas, hortalizas, legumbres, semillas oleaginosas, patatas, té, lúpulo y especias. Esta Directiva se traspuso al ordenamiento jurídico interno español mediante el RD 280/1994, que ha sido modificado por numerosas órdenes ministeriales.

Todas las Directivas europeas se complementaban con la Directiva 91/414/CEE. Transcurridos unos años, se comprobó que existían algunas lagunas que se intentaron cubrir con la Directiva 97/41/CEE. Para incorporar estos cambios, el RD 280/1994 fue modificado por el RD 198/2000 y el RD 290/2003 en lo referente a métodos de muestreo en los productos de origen vegetal y animal.

En febrero de 2005, se publica el Reglamento (CE) N° 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, por el que se aplican criterios comunes para los 25 Estados Miembros sobre la evaluación y fijación de LMR únicos a nivel europeo, con la intención de unificar, simplificar y clarificar el proceso [15].

Existe un límite general de 0,01 mg/kg aplicable «por defecto», es decir, en todos los casos en que no se haya fijado un LMR de forma específica para un producto o un tipo de producto. Asimismo, los LMR son fijados en el límite analítico de determinación cuando su uso no está autorizado o cuando estando autorizado no deberían quedar residuos detectables.

La UE, considerando que los niños durante las etapas de crecimiento son muy vulnerables a los residuos de plaguicidas en su alimentación, y no están lo suficientemente protegidos debido a su menor tamaño y su dieta diferente, ha establecido en la Directiva 2003/13/CE, que modifica la Directiva 96/5/CE, que los alimentos infantiles no deben contener más de 0,01 mg/kg de cualquier residuo de plaguicida.

En el caso del agua, la presencia de plaguicidas en sus fuentes provocó la toma de conciencia sobre la calidad del agua de bebida, que estaba inicialmente gobernada por la Directiva 80/778/EC. Fue revisada en 1998 dando lugar a la actual Directiva 98/83/EC sobre las aguas de consumo, que estipula que los plaguicidas individuales no pueden exceder el nivel de 0,1 µg/l, y la suma de todos los plaguicidas presentes no puede exceder de 0,5 µg/l, ambos fijados en el agua de grifo. Se traspuso al ordenamiento jurídico interno español mediante el RD 140/2003.

En el suelo no se han fijado criterios de calidad a nivel europeo similares a los LMR definidos en los alimentos [16], aunque su fijación con la idea de establecer límites ecológicos, como las concentraciones más altas en las que no se esperan efectos inaceptables, sería un elemento clave para la cuantificación de los riesgos. Las Directivas 91/414/CEE y 96/46/CE, proponen que el límite de determinación de plaguicidas en suelos no debe exceder de 0,05 mg/kg, que es aquella concentración a la cual la materia activa no tiene efectos fitotóxicos sobre otros organismos.

Con el fin de que las discrepancias entre las legislaciones nacionales y las deficiencias que presentan algunas, no constituyan un serio obstáculo, muchas veces injustificado, al comercio internacional de productos vegetales, ciertos Organismos Internacionales se han ocupado del tema. A nivel mundial la FAO y la OMS, a través de su Comisión del Codex Alimentarius, se vienen ocupando de los residuos de plaguicidas desde hace más

de 40 años. El Codex publica cada año unas listas de LMR internacionalmente recomendados. En muchos países se toman como punto de partida o comparación para la fijación de los suyos propios [6].

Fuera del Continente Europeo tienen legislaciones específicas países como EEUU, Japón, Australia, República Sudafricana, Israel y Canadá. En el resto de países no existe una legislación específica como la conocemos en Europa y en muchos casos, ante la falta de legislación, se remiten al Codex Alimentarius.

1.1.4.2. Homologación

La UE ha tratado de armonizar y unificar las legislaciones nacionales de uso y comercialización de productos fitosanitarios. Los primeros avances en la aproximación de las legislaciones nacionales se consiguieron mediante la Directiva 78/631/CEE, de 26 de junio, sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados plaguicidas peligrosos, y mediante la Directiva 79/117/CEE, de 21 de diciembre, sobre la prohibición de comercialización y utilización de productos fitosanitarios que contengan ciertas sustancias activas.

Sin embargo, la armonización no se consiguió hasta la aparición de la Directiva 91/414/CEE (posteriormente modificada por la Directiva 95/36/CE de la Comisión Europea), por la que se estableció el llamado **Registro Único Europeo**. Su objetivo es prevenir los riesgos en origen mediante una evaluación muy exhaustiva en base a unos criterios armonizados, del riesgo de cada sustancia activa y de los productos que la contienen antes de que pueda autorizarse su uso. En este nuevo sistema se condiciona la comercialización de cada uno de los productos a la previa obtención de una autorización oficial, como ya ocurría en cada uno de los Estados miembros.

La comprobación del cumplimiento de los requisitos, se hará mediante ensayos y análisis oficiales, u oficialmente reconocidos, realizándose en las condiciones agrícolas, fitosanitarias y medioambientales adecuadas para su empleo y representativas de las condiciones existentes en las zonas donde el producto vaya a ser utilizado. Estos estudios vienen detallados en el Anexo VI de la Directiva 91/414/CEE, que ha sido modificado por la Directiva 94/43/CE, que establece los principios uniformes para la evaluación y autorización de productos fitosanitarios y a su vez sustituida por la Directiva 97/57/CE.

Se ha establecido un **Proceso de Revisión** que consiste en que cualquier producto fitosanitario comercializado en la UE antes de julio de 1993 ha de presentar estudios para que se incluya en el Anexo I de la Directiva 91/414/EC. La inclusión en este Anexo, es decir en la **Lista Única Positiva** comunitaria de sustancias activas aptas para comercialización, es el prerequisite para el reconocimiento mutuo de autorización en los Estados miembros. Esta inclusión es por un periodo que no puede sobrepasar los 10 años, para asegurarse de que es regularmente revisada en función de los avances científicos y tecnológicos.

La aprobación del uso de sustancias activas fitosanitarias, o sea, su inclusión en la lista única, se basa en que su IDA, la estimación de su persistencia o difusión en el medioambiente y su repercusión en la fauna en las condiciones normales de uso, sea conforme a las denominadas “buenas prácticas agrícolas”. Los productos fitosanitarios sólo se autorizarán, previamente a su comercialización, cuando se utilicen correctamente y:

- No tengan efectos inaceptables sobre las plantas o los productos vegetales.

- No tengan efectos nocivos directa o indirectamente sobre la salud humana, animal ó sobre el agua.
- No tengan una influencia inaceptable sobre el medio ambiente, que tiene prioridad aún por encima de los objetivos de mejora de la producción vegetal.
- Existan métodos de análisis de sus residuos.
- Se establezcan LMR.

Cuando se adoptó la Directiva 91/414/EC en el año 1991, existían 800 materias activas autorizadas para su uso en los Estados miembros y se pretendía evaluarlas todas en 12 años, hasta julio de 2003. De la misma forma, las sustancias ya autorizadas a nivel nacional podían usarse hasta esta fecha o hasta que se autorizasen o prohibiesen a nivel europeo. Sin embargo, el progreso realizado en estas evaluaciones ha sido mucho más lento del que se esperaba originalmente. Debido a que en el 2003 sólo se habían evaluado la mitad de las 800 materias activas, el plazo se ha extendido hasta 2008 [17].

Los dosieres de cada producto se basan en más de 100 estudios diferentes sobre su química, su destino medioambiental, su ecotoxicidad y toxicidad. Esta información no se usa únicamente para llevar a cabo estudios sobre la exposición de los humanos a través de la dieta y de los trabajadores expuestos, sino también para determinar el impacto potencial de estos agroquímicos y sus productos de degradación en el medio ambiente.

La legislación española sobre plaguicidas surge con motivo de la transposición de la Directiva 78/631/CEE, junto con las sucesivas modificaciones posteriores, y queda regulada principalmente por el RD 3349/1983, modificado por el RD 162/1991. Establece que ningún producto fitosanitario podrá ser comercializado en el territorio español si no ha sido previamente autorizado e inscrito en el Registro Oficial de Productos y Material Fitosanitarios, y la necesidad de que las sustancias activas que forman parte de los preparados, sean homologadas y autorizadas. Esta reglamentación ha sido derogada en parte por el RD 2163/1994, de 4 de noviembre, por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización para comercializar y utilizar productos fitosanitarios y que traspone la Directiva 91/414/CEE.

La Orden de 29 de noviembre de 1995, establecía los principios uniformes para la evaluación y autorización de productos fitosanitarios, trasponiendo la Directiva 94/43/CE. Fue modificada por la Orden de 9 de marzo de 1998. La Orden de 11 de diciembre de 1995, a su vez, establece las disposiciones relativas a las autorizaciones de ensayos y experiencias con productos fitosanitarios.

Las sustancias activas pueden tener diferente situación registral en función de si están incluidas o no en el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE, de acuerdo con el registro Europeo y/o con el registro Español. Si se encuentran “En estudio”, se trata de sustancias que aparecen como notificadas por una o más empresas y que aún no han sido incluidas ni excluidas del Anexo I; si están “Incluidas”, están registradas en el Registro Único y pueden utilizarse en la UE; y si se encuentran como “No incluidas”, se ha rechazado su inclusión y, por tanto, su uso.

En otros países, como EEUU, el “Acta de Protección de la Calidad Alimentaria” (*Food Quality Protection Act*) de 1996 fija la forma de homologar todos los plaguicidas registrados antes de 1984 [18]. Los fabricantes deben presentar extensos estudios científicos en base a la Parte 158 del Título 40 del Codex de la Legislación Federal, entre ellos, el comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente después de su aplicación, y la naturaleza y cantidad de residuos que pueden presentarse en los alimentos o en los animales.

A nivel internacional, fueron algunas organizaciones internacionales las que iniciaron la armonización de los requisitos que pedían los gobiernos a los fabricantes de plaguicidas sobre las propiedades de los productos y sus usos, ya que existían diferencias entre países. Entre otros, el JMPR (*Joint Meeting on Pesticide Residues*), formado por grupos de la OMS y de la FAO, está encargado de revisar los datos toxicológicos, las buenas prácticas agrícolas, la composición, el destino medioambiental, el metabolismo, los métodos de análisis de los residuos, y de supervisar los estudios en campo y estimar los residuos máximos de plaguicidas.

1.1.4.3. Programas de vigilancia

Para asegurar la inocuidad de los alimentos es necesario tomar en consideración todos los aspectos de la cadena de producción alimentaria y entenderla como un continuo, desde la producción primaria pasando por la producción de piensos para animales, hasta la venta o el suministro de alimentos al consumidor, pues cada elemento tiene el potencial de influir en la seguridad alimentaria [2]. Es por esto que se hace necesario adoptar medidas encaminadas a garantizar que no se comercializan alimentos no seguros, y que existen sistemas para identificar y afrontar los problemas de seguridad alimentaria causados por los plaguicidas, a fin de asegurar el adecuado funcionamiento del mercado interior y de proteger la salud de las personas.

La verificación del cumplimiento de los LMR es una herramienta importante para evaluar si los usuarios profesionales han aplicado correctamente las recomendaciones y restricciones indicadas en las autorizaciones de los productos fitosanitarios. Un hecho tranquilizador, es que en las prospecciones realizadas sobre alimentos, tanto en origen como en mercados, es bajo el porcentaje de muestras que superan los LMRs establecidos, proporcionando evidencias de que el uso de plaguicidas está bajo control [6].

Mediante programas plurianuales comunitarios y nacionales actualizados cada año, los Estados miembros realizan controles de los residuos de plaguicidas para verificar el cumplimiento de los LMR, principalmente en frutas, verduras y cereales. Dichos controles consisten, en particular, en la toma de muestras, la realización de análisis y la identificación de los plaguicidas presentes, así como sus niveles de residuos respectivos. Las inspecciones y el control deben llevarse a cabo con arreglo a la Directiva 89/397/CEE sobre el control oficial de alimentos, y a la Directiva 93/99/CE.

Además de los programas de control nacionales, se recomienda la participación de los Estados miembros en un programa coordinado a nivel europeo. Se llevan a cabo desde 1996, y pretenden proporcionar una idea del riesgo real de exposición a plaguicidas a través de la dieta. De los resultados obtenidos, se deduce que entre 1996 y 2003 no ha disminuido el porcentaje de muestras de alimentos y piensos en que se encuentran residuos no deseados de plaguicidas por encima de los límites máximos reglamentarios, sino que ha aumentado ligeramente y se ha estabilizado alrededor del 5%, como muestran las continuas actividades de supervisión de los Estados miembros y de la Comisión reflejadas en la Figura 1.3.

En España, para dar cumplimiento a los programas de control europeos, se han establecido varios Planes Anuales desarrollados por las Comunidades Autónomas. Los relativos a productos vegetales son:

I. El *Plan Nacional de Vigilancia de Residuos de Productos Fitosanitarios en Origen* (PNVR), que se encarga de la vigilancia de los residuos mediante controles por muestreo realizados sobre cultivos y productos vegetales destinados a la alimentación

humana o animal, en la fase de producción, en el momento de la recolección o de la entrega a los centros hortofrutícolas, almacenes o personas jurídicas receptoras, o a la salida de los mismos, y en todo caso, previamente a su puesta en circulación por quien haya efectuado el último tratamiento fitosanitario [19].

II. El *Plan de Vigilancia de la Comercialización y de la Utilización de Productos Fitosanitarios* (PVUF), realiza una vigilancia de tipo ambiental del agua, suelo y plantas, durante el periodo en el que el producto no se ha recolectado.

En otros países, como EEUU, existe análogamente un Programa sobre datos de plaguicidas del Departamento de Agricultura (EPA). A nivel internacional, el JMPR, evalúa la exposición indirecta de los consumidores por la presencia de productos fitosanitarios en cantidades residuales en la producción agraria [20].

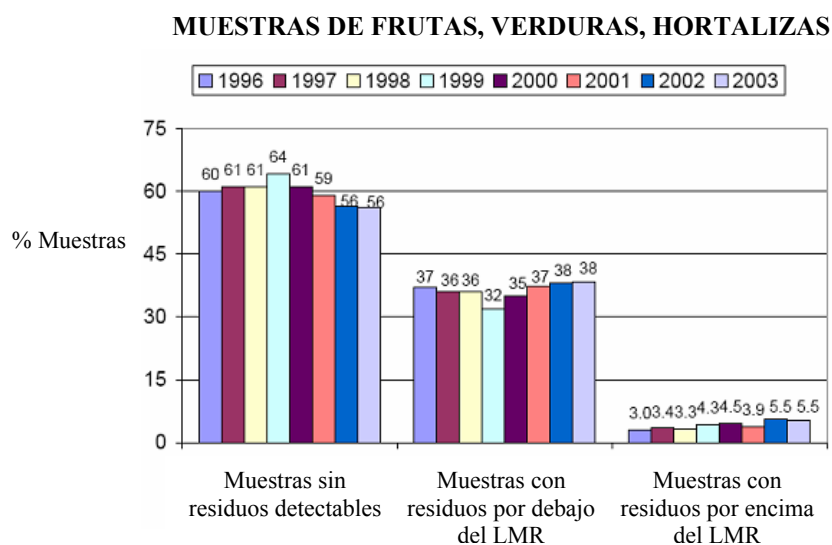


Figura 1.3. Resultados de las muestras de alimentos analizadas en los programas de vigilancia de residuos a nivel europeo. Datos de Eurostat [3].

1.1.4.4. Métodos de Análisis

La gran expansión del uso de productos fitosanitarios ha llevado a los gobiernos a tomar decisiones en la regulación de su utilización, como se acaba de exponer, y ello ha originado un papel muy importante del análisis químico de estos compuestos.

El análisis de los residuos en matrices medioambientales y alimentos es muy importante, no sólo desde el punto de vista de la eficacia del plaguicida, sino también para conocer la naturaleza y cantidad que queda como resultado de la aplicación de las formulaciones en diferentes sustratos, lo que sirve de base para la toxicología y ecotoxicología que es necesaria para el registro y autorización de cualquier producto, y para los programas de control de residuos en los alimentos y el medio ambiente.

En cumplimiento de la Directiva 91/414/CEE, un producto destinado a la protección de las plantas no deberá autorizarse por los Estados miembros a menos que sus residuos puedan determinarse por métodos analíticos apropiados, para asegurar el correcto control de residuos, y con unos Límites de Detección (LD) lo suficientemente bajos que

permitan cuantificar niveles por debajo de los LMRs. Por tanto, los análisis de residuos requieren métodos multiresiduo, bajos LD, la mejor precisión y exactitud y una extensa validación. Estos métodos son la respuesta a la demanda para disminuir el coste de los análisis y aumentar la productividad de los laboratorios [21], teniendo en cuenta que el número de plaguicidas aumenta constantemente y que normalmente no se conoce el historial de tratamientos de la muestra a analizar [22]. Son métodos que requieren universalidad en la extracción y unificación de las condiciones cromatográficas, en la medida de lo posible [21].

El primer intento para definir los requisitos y criterios de los métodos analíticos utilizados para las decisiones sobre las autorizaciones, fue a través de la Directiva 94/43/CE, posteriormente modificada por la Directiva 97/57/CE. En realidad, fue la Directiva 96/46/CE de la Comisión, la que sentó las bases de los métodos analíticos de residuos para cultivos, alimentos y muestras medioambientales. Posteriormente, se desarrolla el documento SANCO/825/00 para proveer con detalles más precisos a los que someten plaguicidas para su autorización, y que proporciona un esquema de métodos multiresiduo estándar para varias matrices. A su vez se ha introducido la guía SANCO/3029/99 rev. 4, para desarrollar métodos analíticos que generen datos relativos al comportamiento de residuos y su destino en el medio ambiente.

Hay un gran número de agencias internacionales y organizaciones gubernamentales con experiencia en el análisis de residuos de plaguicidas. Entre ellas se encuentra la ISO (*International Organization for Standardization*), que incluye 130 países, la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists International*), la IUPAC (*International Union Pure and Applied Chemistry*), el Codex Alimentarius, la OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), y la FAO/OMS. Estas organizaciones llevan a cabo iniciativas para normalizar métodos y establecer protocolos para producir datos con la suficiente calidad y llevar a cabo labores de vigilancia de residuos.

1.1.5. CULTIVO Y PLAGUICIDAS ESCOGIDOS

1.1.5.1. Cebada (*Hordeum Vulgare*)

Castilla y León, tiene una superficie de 94.147 km², lo que representa un 18,7% de la superficie geográfica nacional, con una superficie autonómica que constituye casi la quinta parte del Estado. Esta superficie está repartida en un 42% de tierras de cultivo, un 17,2% de prados y pastizales, un 25,1% de terreno forestal, y un 15,7% de otras superficies. 50.000 km² son llanuras, lo que supone dos tercios de su superficie [23].

Las tierras de cultivo constituyen 3,9 millones de hectáreas (ha.), de las cuales 3,5 millones corresponden a tierras de secano. La agricultura de Castilla y León se puede caracterizar como marcadamente cerealista, ya que los cereales ocupan un 64% de la superficie cultivada, siendo el cultivo más importante tanto en la superficie que ocupa, como en su importancia económica ya que es el que proporciona las mayores aportaciones económicas al sector agrario. De ese 64%, el 56% se cultiva en secano, tipo de explotación que predomina claramente sobre el regadío en toda la Comunidad Autónoma [23].

Tabla 1.2. Resumen regional de superficie, rendimiento y producción de cereales de grano en 2004 [23].

	SUPERFICIE			RENDIMIENTO		PRODUCCIÓN	
	secano	regadío	TOTAL	secano	regadío	GRANO	PAJA COSECHADA
	ha	ha	ha	kg/ha	kg/ha	t	t
CEREALES DE INVIERNO	1.927.201	164.516	2.091.717	0	0	6.895.553	4.029.160
Trigo duro	15.705	33	15.738	2.319	3.818	36.540	---
Trigo blando	560.428	43.032	603.460	3.540	5.058	2.201.331	---
Trigo total	576.133	43.065	619.198	3.506	5.057	2.237.871	1.262.313
Cebada 6 carreras	224.674	21.117	245.791	3.079	5.001	797.361	---
Cebada 2 carreras	951.395	89.171	1.040.566	3.173	4.882	3.453.924	---
Cebada total	1.176.069	110.288	1.286.357	3.155	4.905	4.251.285	2.559.211
Avena	110.507	8.821	119.328	2.293	3.361	283.024	130.955
Centeno	63.013	2.304	65.317	1.788	2.739	118.998	72.610
Tranquillón	16	0	16	1.483	.	24	23
Triticale	1.463	38	1.501	2.891	3.211	4.351	4.048
CEREALES DE PRIMAVERA	594	131.311	131.905	.	.	1.291.907	54.712
Maíz	587	131.231	131.818	4.783	9.819	1.291.411	54.708
Sorgo	6	80	86	4.000	5.888	495	4
Mijo	1	0	1	1.000	0	1	0
OTROS CEREALES	401	6	407	1.602	3.917	666	478
TOTAL CEREALES GRANO	1.928.196	295.833	2.224.029	.	.	8.188.126	4.084.350

Ha. Hectárea

t. Tonelada

La superficie de cultivos herbáceos de secano (en torno a 2,5 millones de ha), sumadas a las destinadas a barbecho (en torno a 700.000 ha), superan los 3,2 millones de ha, equivalentes a más del 86% de la superficie geográfica de la región. El secano castellano-leonés está prácticamente copado por la cebada y el trigo (Tabla 1.2) que, junto con los restantes cereales, constituyen el único aprovechamiento posible en gran parte del territorio [4]. Esta tendencia al monocultivo viene determinada por las fuertes limitaciones edafoclimáticas que reducen la posibilidad de diversificación de cultivos.

A nivel europeo, los dos cereales que se cultivan más abundantemente, y por tanto, en los que más cantidad de plaguicidas se usan, son el trigo, en mayor cantidad, y la cebada, como se muestra en la Figura 1.4 [4]. Sin embargo, se observa que la producción de cebada a nivel español, es mayor que la del trigo.

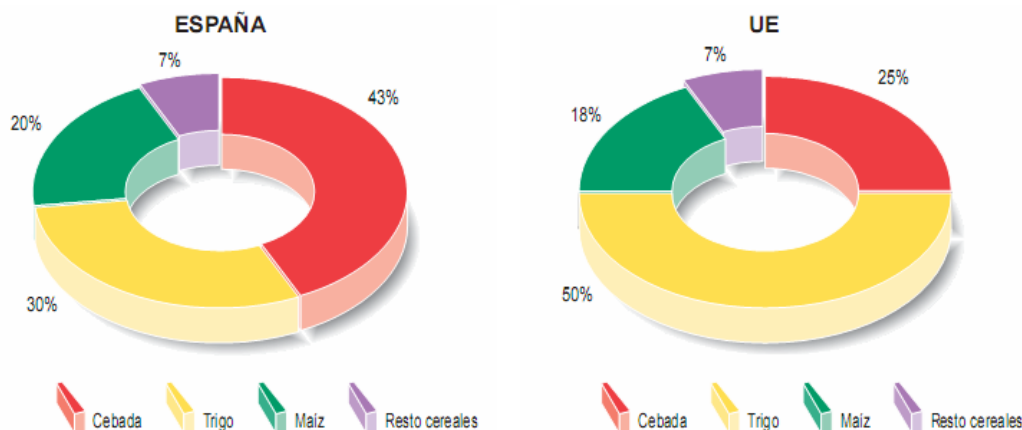


Figura 1.4. Estructura de la producción de cereales en España y la UE [4].

1.1.5.2. Malas Hierbas y Herbicidas. Importancia económica en la Agricultura

Un problema muy importante que produce pérdidas de producción en los cultivos es el de la competencia con otras plantas no deseadas, las conocidas como “*Malas Hierbas*”. De entre las aproximadamente 250.000 especies de plantas existentes en el mundo, 8.000 especies se consideran malas hierbas, de las cuales unas 200-250 son especialmente dañinas para la agricultura [24].

Las malas hierbas no atacan a las plantas directamente pero su presencia tiene impactos negativos en la producción, calidad y seguridad de los cultivos. Compiten por el agua, los nutrientes, el dióxido de carbono, la luz, el espacio, las abejas polinizadoras, además de servir como huéspedes para varias plagas (principalmente insectos, hongos y ácaros), enfermedades de las plantas y roedores.

Las pérdidas económicas provocadas por las malas hierbas en los cultivos de cereal superan con creces a las de las otras plagas. De acuerdo con datos de la FAO, las pérdidas se elevan al 11,4% de la producción de cereales [25].

La aparición de las malas hierbas en los cultivos cerealistas es un problema muy importante a resolver en cuanto a la optimización de las cosechas, haciéndose imprescindible su eliminación para obtener unas producciones acorde a las necesidades de los agricultores. Esta eliminación de plantas perjudiciales se ha llevado a cabo de diversas formas desde tiempos remotos, influyendo en la presencia de malas hierbas, la preparación del terreno, las rotaciones del cultivo, el uso de métodos mecánicos y, evidentemente, el uso de *Herbicidas*, constituyendo el método más utilizado por su facilidad, eficacia y bajo coste [26-27]. Debido a que maximizan los rendimientos agrícolas y minimizan las necesidades de mano de obra, se emplean a gran escala y generalmente se consideran fundamentales en los modernos sistemas de cultivo.

Los Herbicidas pueden clasificarse en diferentes grupos en función de varios factores, ya que controlan las malas hierbas de formas diferentes, con diferentes modos de acción, selectividad y características de aplicación. Las clases se definen en función de:

- Su principal ruta de entrada (raíces u hojas) y, por tanto, su vía de aplicación (aplicación en el suelo o foliar),
- Su capacidad de traslocación (sistémicos o de contacto),
- Su época de aplicación (pre-emergencia o post-emergencia),

- Su selectividad (selectivos o no selectivos),
- Su estructura química.

En España se producen cereales en una gran extensión, en zonas en las que resulta muy difícil alternarlos con otros cultivos y el control de las malas hierbas es una de las operaciones de cultivo más importantes en ellos [26]. De hecho, el uso de herbicidas en España aumentó un 10,7% en el periodo de 1995 a 2001 [25]. Considerando la superficie dedicada en Castilla y León a los cereales y las dosis de empleo de los herbicidas aconsejadas por los fabricantes, puede estimarse que anualmente se aplican unas 1.500 toneladas de estos productos en los suelos de nuestra región [28]. Sin embargo, la utilización excesiva de herbicidas sin un uso racional de los mismos, conduce a diversos problemas, desde la inversión de la flora hasta la presencia de poblaciones resistentes, y la posibilidad de generación de residuos en el suelo de cultivo, que se hace extensible a las cuencas acuíferas y por lo tanto al medio ambiente, y al propio cereal cultivado. Por todo ello, la situación actual es de búsqueda de la integración de los distintos métodos de control, de forma que sea económicamente eficaz, y se eviten en la medida de lo posible los problemas que del mismo se puedan derivar [26].

1.1.5.3. Contaminación del Suelo: Estudios en Campo

El suelo se define generalmente como la capa superior de la corteza terrestre, formada por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos. Almacena, filtra y transforma muchas sustancias, incluidas el agua, los nutrientes y el carbono. Evoluciona transformándose hasta alcanzar el equilibrio con las condiciones ambientales y a partir de ese momento tiende a permanecer estable. Como su formación es un proceso extremadamente lento, puede considerarse como un recurso no renovable.

A su vez se le considera un sistema auto-depurador ya que es capaz de degradar o inmovilizar los contaminantes [27]. De cualquier forma, por muy favorables que sean las características del suelo, es evidente que su capacidad depuradora no es ilimitada. De hecho, está sometido a presión desde el punto de vista medioambiental, ya que no puede asimilar, inmovilizar, inactivar y degradar todos los contaminantes que recibe y por ello, en un determinado momento, cuando se superan unos determinados umbrales, puede transferir los contaminantes a otros medios e incorporarlos en las cadenas tróficas [8].

La degradación de los suelos constituye un problema grave para Europa. Está provocada o acentuada por las actividades humanas, en especial, las prácticas agrícolas inadecuadas (Figura 1.5). Como resultado, disminuye la fertilidad de los suelos, el carbono, la diversidad biológica y la capacidad de retención del agua, se ven perturbados los ciclos de los gases y de los nutrientes, y se retrasa la degradación de las sustancias contaminantes [29].

El suelo agrícola es un recurso inestimable y limitado, cuyo valor se debe a la labor desarrollada por el hombre durante décadas e incluso siglos. La degradación irreversible de este recurso supone no sólo destruir el bien más preciado de los agricultores sino hipotecar las oportunidades agrícolas de generaciones futuras. Por este motivo, las políticas de protección de suelos han de prestar especial atención al uso sostenible y a la gestión de los suelos agrícolas con el fin de garantizar su fertilidad y valor agronómico.

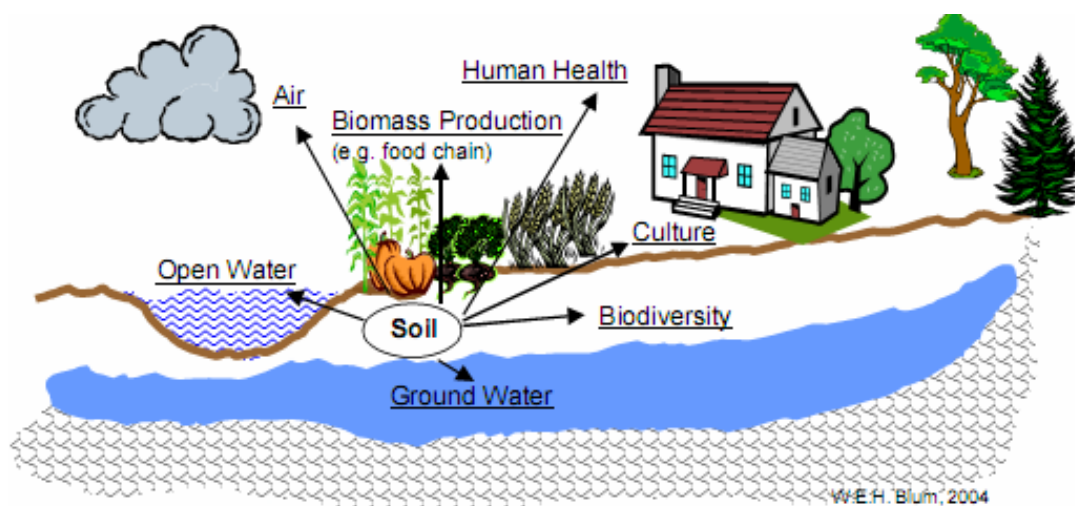


Figura 1.5. Influencia de la contaminación del Suelo en otros compartimentos del entorno.

El grave problema que representa la contaminación de los suelos es un aspecto que se ha empezado a tener en cuenta recientemente. Antes de la década de los 70 se hablaba de la contaminación del aire y del agua, pero se consideraba que el suelo tenía una capacidad de auto-depuración casi infinita. La sensibilidad mundial comenzó a cambiar a partir de la declaración de la "Carta Europea de Suelos" desarrollada por la Comunidad Europea en 1972.

Actualmente, sólo algunos Estados miembros tienen legislación específica para la protección del suelo. A nivel europeo, existen varias Directivas (de aguas, residuos, sustancias químicas, contaminación industrial, protección de la naturaleza, plaguicidas y agricultura) que contribuyen a su cuidado, pero no son suficientes para asegurar un adecuado nivel de protección del suelo en toda Europa. Debido a esto, en septiembre de 2006, la Comisión ha adoptado una Estrategia para la Protección del Suelo, que forma parte del 6^o Programa sobre Medio ambiente [29]. Sus objetivos son la prevención de la erosión, deterioro y contaminación del suelo, prestando especial atención al impacto provocado por los plaguicidas.

El suelo representa un sumidero medioambiental de agroquímicos, y como resultado, es importante contar con información sobre la persistencia, movilidad y degradación de los plaguicidas en él. En particular, de todos los herbicidas existentes en el mercado, dos terceras partes de los mismos son activos a través del suelo, lo que implica que existe la necesidad de un primer contacto entre el herbicida y el suelo. Los herbicidas pueden llegar al suelo de formas diferentes: por aplicación directa; por aplicación indirecta, a través de las malas hierbas o del follaje del cultivo; por lixiviación; por el uso de agua contaminada para riego y por último, desde la atmósfera por deposición. La dispersión de los herbicidas hacia otros compartimentos del medio ambiente dependerá de su comportamiento en los suelos, y en particular, de la intensidad de su retención [30].

En la actualidad el desarrollo de un nuevo plaguicida, está sufragado habitualmente por los departamentos de agroquímicos de las grandes compañías privadas. Dicho desarrollo es un proceso largo y costoso, en el que se han de realizar numerosos estudios de síntesis, agronómicos, toxicológicos y de residuos. Los fabricantes, según la Directiva 91/414/CEE, están obligados a evaluar, entre otros, los riesgos medioambientales para el suelo mediante el desarrollo de estudios de persistencia y de degradación. Hay que

tener en cuenta que en muchos casos la información que ofrecen las casas comerciales es insuficiente para definir el comportamiento de cada producto en los diferentes tipos de suelos. Los datos no son extrapolables de unas climatologías a otras o incluso en diferentes épocas del año, lo que hace necesario el planteamiento de estudios específicos en campo. Es de interés el disponer de información real de las posibilidades de utilización de cada producto en diversos lugares, ya que muchas veces los estudios están realizados sobre suelos, cultivos y condiciones ambientales muy diferentes a las que luego se encuentran en los distintos países donde van a aplicarse.

1.1.5.4. Contaminación del Cultivo: Análisis de Residuos

Una vía importante de eliminación de los herbicidas es la debida a la absorción de los mismos por las plantas que combaten. Sus mecanismos de funcionamiento son por absorción y posterior fijación en centros específicos donde inhiben determinados enzimas responsables del crecimiento, síntesis de proteínas, etc. También se produce una absorción por los cultivos a los que son selectivos, lo cual implica la inactividad del herbicida, que puede llegar a ocasionar problemas de acumulación dentro de la planta.

Teniendo en cuenta la naturaleza fitotóxica de los herbicidas y su baja toxicidad para los mamíferos, sus residuos en los cultivos no suelen plantear problemas, pero se ha observado contaminación en algunos alimentos. Incluso en ese caso, el riesgo de ingerir dosis tóxicas por los humanos a través de los alimentos es bajo pero, es importante analizar la presencia de residuos, debido a su amplio uso [21].

De la producción media española de cereales durante el periodo 1996-2001, del orden de 13 millones de toneladas fueron destinadas al consumo animal, siendo el más importante la cebada [4]. El destino final de la cebada producida en la región de Castilla y León es mayoritariamente la elaboración de piensos para alimentación animal, sobre todo de la cebada de 6 carreras.

Pequeñas cantidades de herbicidas absorbidos por las plantas pueden pasar junto con los piensos a los animales herbívoros, que constituyen una parte muy importante de la alimentación humana y, por tanto, es necesario controlar la presencia de estas sustancias en este tipo de productos. Las autoridades están empezando a interesarse por los efectos que tiene el procesado en los residuos de plaguicidas de los alimentos. Por ejemplo, el JMPR incluye estos estudios en las revisiones que realiza sobre residuos. Estos datos son necesarios para tranquilizar a los consumidores sobre el contenido real de residuos en los alimentos, y como dato adicional para fijar los LMR [31].

1.1.5.5. Impacto provocado por la Agricultura. Ayudas Agroambientales

Los cambios de uso del suelo en casi toda Europa, han ocasionado alteraciones importantes, entre ellas, el declive y la pérdida de diversidad de hábitats naturales, su degradación y contaminación. Una de las mayores presiones proviene de la agricultura intensiva que empobrece el suelo [17].

Numerosos estudios han demostrado los vínculos existentes entre las prácticas agrícolas y la biodiversidad, siendo el uso insostenible de productos fitosanitarios una de las actividades que más le afectan. En la mayoría de los Estados miembros se han aplicado medidas agroambientales para conservar la biodiversidad, entre ellas, la reducción o eliminación gradual del uso de plaguicidas.

Hace unos años se consideraban intereses contrapuestos la defensa a ultranza del medio ambiente y el desarrollo de la actividad agraria. Actualmente es posible conciliar ambas

posturas a través de un desarrollo sostenible [4]. La última reforma de la Política Agraria Comunitaria (PAC), ha sido concebida para conseguir una mayor competitividad e integrar mejor los requisitos medioambientales. Garantizar unas prácticas agrícolas que protejan el medio ambiente y preserven el paisaje es parte del conjunto de medidas consensuado. Se ha planteado el problema del deterioro del medio ambiente y en especial del suelo, al que se intenta poner freno mediante el fomento de prácticas agrícolas compatibles con la protección de la naturaleza, favoreciendo el abandono de los cultivos intensivos a través de la retirada de tierras en el sector de los cultivos herbáceos y el barbecho.

Las prácticas agrarias para proteger el medio ambiente se incorporan en el Reglamento del Consejo (CE) nº 1259/1999, por el que se establecen las disposiciones comunes aplicables a los regímenes directos de ayuda en el marco de la PAC. Este Reglamento establece un vínculo entre los requisitos de protección del medio ambiente y la ayuda directa de la PAC a los productores, de tal forma que los pagos en compensación quedan supeditados al cumplimiento de compromisos agroambientales.

La UE ha promulgado importantes Directivas comunitarias que influyen de forma directa en el sector agrario, destacando especialmente, la Directiva 79/409/CEE, de 2 de abril de 1979, o Directiva “Aves” y la Directiva 92/43/CEE, de 21 de mayo de 1992, o Directiva “Hábitats”, que constituyen los instrumentos más importantes de la UE para conseguir la conservación de los hábitats, las especies y la biodiversidad. En virtud de ambas directivas se creó la Red Natura 2000. Está formada por Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA) y Zonas de Especial Conservación (ZEC).

España alberga aproximadamente el 60% de los hábitats y el 40% de las especies de interés comunitario incluidas en dicha Directiva, y aporta 12 millones de ha a la red Natura, es decir, un 24% de la superficie nacional. Los sistemas agrarios extensivos han contribuido a que España sea una de las grandes reservas ecológicas de Europa Occidental. Muchos de los cultivos de cereal extensivos asociados a la práctica del barbecho, han supuesto una práctica enriquecedora de la biodiversidad al formar ecosistemas pseudoesteparios que albergan las últimas poblaciones de algunas aves esteparias europeas amenazadas.

En las llanuras cerealistas de Tierra de Campos en Castilla y León, la práctica ausencia de otros aprovechamientos del suelo, implica la total conexión entre sistema agrícola y hábitat [4]. Estas llanuras cerealistas, con más de 4 millones de ha, albergan una de las comunidades de aves esteparias de mayor interés de toda Europa. Estas especies conservan en este territorio las poblaciones más numerosas de la península, como es el caso de la Avutarda, con alrededor de 10.000 individuos, considerada como especie Globalmente Amenazada y Vulnerable a nivel mundial.

1.2. HIPÓTESIS

El mantenimiento de una agricultura tradicional de secano en las estepas cerealistas de Castilla y León orientada preferentemente al cultivo del cereal, ha sido uno de los factores que ha propiciado la conservación de las mayores concentraciones mundiales de una de las aves esteparias más importantes y amenazadas, la Avutarda.

Sin embargo, a partir de los años 60 se inicia una etapa de reforma de las estructuras agrarias para implantar métodos de cultivo extensivos modernos. Esta nueva agricultura se ha caracterizado por el uso indiscriminado de herbicidas, una de las amenazas responsables de la delicada situación de conservación actual de la Avutarda, lo que ha supuesto su consideración como especie Globalmente Amenazada y Vulnerable a nivel mundial.

Para mejorar la situación de esta especie, el 22 de julio de 1993, la Comisión Europea aprueba el “Programa Zona de las Estepas Cerealistas de Castilla y León” (*ORDEN de 17 de noviembre de 1993*, BOCyL de 18 de noviembre) con el objetivo de proporcionar ayudas a los agricultores siempre que se comprometan a cooperar en el desarrollo de métodos agrícolas que protejan el medio ambiente. Entre otras medidas, sólo está permitido el uso de herbicidas del tipo AAA o “Baja Toxicidad”, y éstos dentro de unos niveles fijados.

Se hace pues necesario disponer de métodos multirresiduo que permitan controlar mediante análisis programados que los herbicidas utilizados en el cultivo de cebada, mayoritario en esta zona, se encuentran dentro de los recomendados. Los herbicidas se depositan en los suelos agrícolas indirectamente a partir de las hojas de los cultivos, y directamente a partir de los tratamientos en el suelo. Además, pueden ser adsorbidos por las plantas, que pueden pasar junto con los piensos a los animales herbívoros que constituyen una parte muy importante de la alimentación humana y, por tanto, es necesario controlar la presencia de estas sustancias en este tipo de matrices. Debido a que el carácter de confidencialidad de las casas comerciales no permite precisar el tipo y cantidades de fitosanitarios más utilizados, se deben seleccionar, para su estudio en suelo y cebada, una amplia variedad de familias aplicadas en cereales.

Además y con objeto de reducir los riesgos que pueda tener el uso de determinados herbicidas sobre el medio ambiente, en particular sobre el hábitat de la avutarda, es conveniente conocer el comportamiento de los mismos una vez aplicados. En muchos casos la información que ofrecen las casas comerciales es insuficiente para definir el comportamiento de cada producto en los diferentes tipos de suelo ya que los estudios están realizados en condiciones muy diferentes a las de utilización. Es de interés, por tanto, el disponer de información real sobre la disipación de estos herbicidas en suelos típicos de las estepas cerealistas.

1.3. OBJETIVOS

En base a la justificación expuesta en la introducción, se plantean los siguientes objetivos principales del trabajo:

1. Optimizar los parámetros cromatográficos para desarrollar un método multiresiduo que permita el análisis del mayor número posible de herbicidas a la vez, de entre los aplicados en cebada, y con la mejor sensibilidad para alcanzar los menores límites posibles. Evaluar diferentes técnicas, HPLC-DAD, GC-AED, GC-MS, PTV-GC-TOF/MS y LC-(ESI)-MS/MS para estudiar cual es la más adecuada a las necesidades de las muestras que se van a analizar (*Capítulo 2*).
2. Desarrollar un método multiresiduo único para herbicidas de diferentes características en muestras de suelo, a través del estudio de la influencia de distintos factores en las recuperaciones, optimizarlo y validarlo de acuerdo a la reglamentación europea (*Capítulo 3*).
3. Comparar los métodos multiresiduo clásicos para material vegetal, con una modificación de un método novedoso denominado *QuEChERS*, para la extracción de residuos de herbicidas en muestras de grano y paja de cebada. Seleccionar el método más adecuado y validarlo según la reglamentación europea (*Capítulo 4*).
4. Estudiar mediante ensayos en campo la disipación en condiciones reales, de 12 herbicidas, en el suelo de una parcela típica de las estepas cerealistas donde se sembrará cebada en condiciones de secano. Seguir los niveles de residuos de herbicidas en la capa arable del suelo y en el cultivo de cebada (*Capítulo 5*).
5. Realizar el análisis de residuos de herbicidas en muestras de suelo procedentes de fincas agrícolas de cereal cuyos propietarios estén sujetos al Programa de las Estepas Cerealistas (*Capítulo 6*).

1.4. BIBLIOGRAFÍA

1. K.D. Racke. *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 1905.
2. Reglamento CE Nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
3. Comunicación 372 de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones, sobre la “Estrategia temática sobre el uso sostenible de los plaguicidas”. Bruselas. 2006.
4. “Libro blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural”. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España. 2003.
5. C.R. Taylor. “Economic Impacts and Environmental and Food Safety Tradeoffs of Pesticide Use Reduction on Fruit and Vegetable”. Universidad de Auburn. 1995.
6. R. Coscollá. “Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales”. Mundi Prensa Libros S.A. 1993.
7. S. Forman, J. Novák, R. Tykva, J. Kás, Z. Wimmer, T. Ruml. *Chemosphere* 46 (2002) 209.
8. S.J. Lehotay, K. Maštovská. “Determination of Pesticide Residues. Methods of Determination of Food Components”. S. Otles (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. 2004.
9. H.H. Cheng (Ed.). “Pesticides in the Soil environment: processes, impacts and modelling”. Soil Science Society of America, Inc. Madison. 1990.
10. “The WHO recommended classification of pesticides by hazards. Guidelines for classification”. Organización Mundial de la Salud. 2004.
11. “Environmental risk assessment scheme for plant protection products”. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Standards. OEPP/EPPO Bulletin 33 (2003) 99.
12. V. Teruel Muñoz. “Límites máximos de residuos de productos fitosanitarios”, Edición 2.3. Ministerio de Agricultura y Pesca. 2003.
13. B.F. Rasmussen. *Sci. Total Environ.* 188 (1996) 45.
14. L. Levitan. “An overview of pesticide impact assessment systems based on indexing or ranking pesticides by environmental impact”. Workshop on Pesticide Risk Indicators, Copenage, Dinamarca. 1997.
15. “The New MRL Regulation 396/2005. An Agrochemical Industry Point of View: The New Era in Europe can be Successful”. International Symposium of Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries, Valencia. 2005.
16. Opinión C2/JCD/csteeop/Ter91100/D(0) del Comité Científico en Toxicidad, Ecotoxicidad y Medio ambiente. “The available scientific approaches to assess the potential effects and risk of chemicals on terrestrial ecosystems”. Bruselas. 2000.
17. Comunicación 162 de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. “Plan de Acción sobre Biodiversidad en la Agricultura”. Volumen III. Bruselas. 2001.

18. P.W. Lee (Ed.). "Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals", John Wiley & Sons Ltd., 2003.
19. Orden de 20 de julio de 1990 por la que se implanta el "Programa Nacional de Vigilancia de Residuos de Fitosanitarios en Origen". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (BOE n. 177 de 25/7/1990).
20. "Pesticide residues in food. Evaluations. Part I – Residues". FAO plant production and protection paper 182/1. Joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO core assessment group. Roma. 2004.
21. J. Tekel, J. Kovacicová. J. Chromatogr. A. 643 (1993) 291.
22. K. Mastovska. "Food & Nutritional Analysis: pesticide residues". Encyclopedia of Analytical Science. P. Worsford, A. Townshead, C. Poole (Eds.), Academic Press. 2004.
23. Anuario de Estadística Agraria de Castilla y León. 2004. Recurso electrónico. www.jcyl.es.
24. D.D. Lingenfelter. "Introduction to weeds and herbicides", Publication No. CAT UC175. Extensión de Investigación Agrícola. Universidad de Pensilvania. 2002.
25. A.E.P.L.A. Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas. www.aepla.es.
26. R. de Prado, J.V. Jorrín. "Uso de Herbicidas en la Agricultura del siglo XXI". 2ª Ed. Universidad de Córdoba. 2001.
27. "Integrated Weed Management: An Introductory Manual". <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/weedman.htm>.
28. A. Herguedas, J. Atienza, J. Alvarez-Benedí. "Progresos en la Investigación en Zona no Saturada". Vol 3. A. González, D. L. Orihuela, E. Romero, R. Garrido. (Eds.). Universidad de Huelva. 1998.
29. Comunicación 231 de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones, por la que se establece la "Estrategia temática para la protección del suelo". Bruselas. 2006.
30. E. Barriuso, R. Calvet, M. Schiavon, G. Soulas. Etude et Gestion des Sols 3/4 (1996) 279.
31. P.T. Holland, D. Hamilton, B. Ohlin, M.W. Skidmore. Pure Appl. Chem. 66-2 (1994) 335.

CAPÍTULO 2:
DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS
MULTIRRESIDUO DE HERBICIDAS

ÍNDICE

2.1. Introducción	32
2.1.1. Técnicas de Análisis de Residuos de Herbicidas	32
2.1.1.1. Técnicas Cromatográficas	32
2.1.1.2. Otras Técnicas	36
2.1.2. Analitos	37
2.1.2.1. Grupo I: Directamente analizables por GC	40
2.1.2.2. Grupo II: Termolábiles. Análisis por GC de sus Productos de Degradación Térmica	41
2.1.2.3. Grupo III: Polares. Análisis por GC previa Derivatización	43
2.1.3. Métodos de Optimización	45
2.1.4. Evaluación del Efecto Matriz	46
2.1.5. Objetivos	48
2.2. Material y Métodos	49
2.2.1. Reactivos	49
2.2.2. Analitos	49
2.2.3. Material de Laboratorio	49
2.2.4. Equipos	50
2.2.4.1. HPLC-DAD	50
2.2.4.2. GC-AED	50
2.2.4.3. GC-MS	51
2.2.4.4. PTV-GC-TOF/MS	52
2.2.4.5. LC-(ESI)-MS/MS	53
2.2.5. Optimización de la Derivatización del Grupo III	54
2.2.6. Estudio del Efecto Matriz	56
2.2.6.1. Test t de igualdad de las pendientes	56
2.2.6.2. Solapamiento de los intervalos de confianza de las pendientes	58
2.2.6.3. Ajuste de ambos calibrados a una línea	59
2.3. Resultados y Discusión	60
2.3.1. HPLC-DAD	60
2.3.1.1. Optimización de la Fase Móvil	60
2.3.1.2. Detección	60
2.3.2. GC-AED	61
2.3.2.1. Optimización del programa de Temperaturas	61
2.3.2.2. Detección	61
2.3.2.3. Validación	62
2.3.3. GC-MS	64
2.3.3.1. Optimización de la Inyección	64
2.3.3.2. Optimización del programa de Temperaturas	64
2.3.3.3. Detección	65
2.3.3.4. Optimización de la Derivatización del Grupo III	67
2.3.3.5. Adición de Modificadores	73
2.3.3.6. Validación	74
2.3.4. PTV-GC-TOF/MS	76
2.3.4.1. Optimización de la Inyección	76

2.3.4.2. Optimización del programa de Temperaturas	76
2.3.4.3. Detección	76
2.3.4.4. Validación.....	76
2.3.5. LC-(ESI)-MS/MS	77
2.3.5.1. Optimización de la Fase Móvil.....	78
2.3.5.2. Detección	79
2.3.5.3. Validación.....	80
2.3.6. Comparación de las diferentes técnicas de análisis.....	81
2.3.7. Estudio del Efecto Matriz	82
2.4. Conclusiones.....	84
2.5. Bibliografía.....	86

2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se expone el proceso de selección de los parámetros cromatográficos para obtener las condiciones óptimas con el fin de determinar los residuos de herbicidas en las muestras objeto de estudio que se generen a lo largo de este trabajo.

2.1.1. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE HERBICIDAS

En este apartado se presenta un resumen de las técnicas utilizadas para la detección de residuos de herbicidas. Teniendo en cuenta la variedad de técnicas analíticas utilizadas en este trabajo, se ha considerado que un desarrollo detallado del fundamento y características de cada una haría esta parte demasiado extensa. Por esta razón, se ha incluido únicamente una breve introducción de las técnicas, así como una explicación más detallada de aquellos aspectos que influyen directamente sobre los métodos de análisis desarrollados.

2.1.1.1. Técnicas Cromatográficas

El análisis de los herbicidas se ha llevado a cabo mediante diferentes métodos que se han ido modificando a medida que las técnicas instrumentales se desarrollaban. Existe abundante bibliografía sobre el tema que se amplía continuamente con la aplicación de nuevas técnicas analíticas, la determinación de nuevos productos y la modificación de métodos existentes, con la finalidad de determinar simultáneamente el mayor número de analitos posible.

Inicialmente los residuos de herbicidas se determinaban por procedimientos que se basaban generalmente en hidrólisis ácidas o básicas seguidas de reacciones de derivatización. El problema era que estos métodos eran demasiado laboriosos y normalmente no permitían distinguir entre el herbicida y sus metabolitos.

El desarrollo del análisis de estos residuos, ha estado muy unido a los desarrollos en cromatografía. Se trata de una de las técnicas más versátiles para realizar separaciones de un gran número de sustancias orgánicas y organometálicas. Ninguna otra técnica de separación proporciona una resolución equivalente y a la vez una sensibilidad tan elevada.

La separación cromatográfica se debe a un avance diferencial a lo largo de una fase estacionaria de las distintas fracciones de solutos inyectados al ser arrastrados por una fase móvil; es decir, unas fracciones se propagan más rápido que otras, de manera que abandonan la fase estacionaria a distintos tiempos, lo que permite su separación [1].

Los primeros trabajos se desarrollaron en papel o en capa fina que resultaban en separaciones pobres que sólo proporcionaban información semicualitativa. Sin embargo, son la cromatografía de gases (GC) y la de líquidos (LC), desarrolladas posteriormente, las dos técnicas más ampliamente utilizadas para el análisis de residuos. El utilizar una u otra depende de la naturaleza y el comportamiento de los analitos. Para compuestos iónicos y térmicamente inestables se usa LC, mientras que para compuestos volátiles y termoestables, se prefiere GC.

Cromatografía de Gases (GC)

GC es una de las técnicas más utilizadas para analizar residuos de herbicidas en muestras agro-medioambientales, debido a su alto poder de separación, a su fácil acoplamiento con detectores específicos y muy sensibles, y a la gran variedad de

compuestos analizables por esta técnica. De hecho puede usarse para separar cerca del 80% de los plaguicidas que se usan actualmente o que son de interés para el análisis de residuos [2].

Los cromatógrafos de gases están formados por un sistema de inyección, un horno donde se encuentra la columna cromatográfica donde se producen las separaciones, un detector, y un ordenador que recoge y procesa la señal.

Existen diferentes técnicas de Inyección en GC. La inyección en *splitless*, común en el análisis de trazas, produce pérdidas de analitos en cierta medida y está muy influida por los co-extractos de la matriz. El efecto matriz puede disminuir significativamente mediante el uso del *pulsed splitless*, que utiliza un pulso de presión del gas portador durante la inyección, aunque a concentraciones bajas de analitos puede seguir afectando [3].

En los últimos años han surgido nuevos inyectoros, como el *Programmable Temperature Vaporisation* (PTV). La muestra se inyecta a temperaturas por debajo del punto de ebullición del disolvente y la temperatura del *inlet* se mantiene baja mientras el vapor de disolvente se elimina por la salida del *split* [3]. Después del venteo, el *inlet* se calienta rápidamente y los analitos se transfieren a la columna. Sus ventajas frente a otras técnicas de inyección consisten en que disminuye la discriminación de los analitos durante la inyección, y se recuperan mejor los compuestos termodegradables y los no volátiles, además de disminuir el efecto matriz [4]. Sin embargo, su característica más importante es que permite introducir grandes volúmenes de muestra (hasta ml) en el sistema cromatográfico. El proceso analítico se simplifica al eliminar el paso de evaporación del disolvente y pueden disminuirse los límites.

Al principio se usaban Columnas empaquetadas, pero han sido reemplazadas por columnas capilares de polaridad media o baja, que precisan de un control electrónico de temperaturas. Las columnas deben ser muy inertes y poseer un gran poder de resolución. Las que se usan normalmente para el análisis de residuos de herbicidas están formadas por fenil polimetilsiloxanos.

Se utilizan varios Detectores selectivos para el análisis de trazas de herbicidas. Se detallan a continuación los utilizados en este trabajo.

El ***Detector de Emisión Atómica*** (AED) tiene su principal ventaja en su capacidad para determinar simultáneamente las emisiones atómicas de muchos elementos de los analitos que eluyen de la columna capilar de GC. Un plasma de helio a 5000°C inducido por microondas destruye los compuestos y los átomos formados son excitados por la energía del plasma. La luz emitida por las partículas excitadas se separa en líneas individuales por un fotodiodo array (Figura 2.1). La frecuencia de la luz emitida es específica de cada elemento y se usa para identificarlo. Se monitorizan normalmente las líneas de los átomos de hidrógeno y carbono, así como líneas más específicas de cloro, azufre, nitrógeno o fósforo. El AED desplazó al ECD (detector de captura electrónica), en un papel complementario al GC-MS en el análisis de residuos de plaguicidas [5]. Existen varios métodos propuestos por la EPA que lo utilizan para el análisis de residuos de plaguicidas (Método EPA 8085, *Compound-Independent Elemental Quantitation of Pesticides by GC-AED*, y Método EPA 6010B, *Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*).

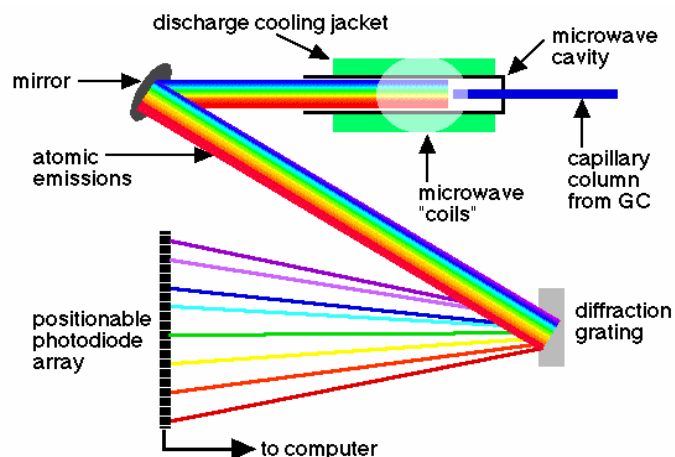


Figura 2.1. Esquema de un AED.

Los *Detectores de Espectrometría de Masas* (MS) permiten la determinación de los analitos con gran sensibilidad y selectividad, al mismo tiempo que los identifican a nivel de trazas por medio de su espectro de masas característico. Éste está formado por iones que vendrán definidos por su relación de masa:carga (m/z). Son detectores universales y, gracias a la identificación mediante espectros característicos, no hace falta que se produzca la separación total de los analitos, como en el caso de otros detectores donde el solapamiento de picos cromatográficos siempre es problemático. Por estas ventajas y para evitar posibles fallos en la identificación, los detectores tradicionales están siendo rápidamente desplazados por detectores MS para el análisis de residuos de plaguicidas.

Están formados por un sistema de vacío, una fuente de iones, que los genera a partir de los analitos que provienen de la columna, un analizador de masas que permite la separación, detección y cuantificación de los analitos en estudio, un sistema de detección, y un ordenador que recoge y reprocessa los datos.

La ionización más utilizada para producir iones en espectrometría de masas es el *Impacto Electrónico* (EI). Al mismo tiempo que las moléculas de analito se introducen en el espectrómetro de masas, son bombardeadas con electrones energéticos que las fragmentan produciendo iones cargados positivamente, M^+ , producidos por la pérdida de un único electrón.

Existen diferentes analizadores de masas, siendo uno de los más corrientes el *Cuadrupolo* (Figura 2.2 a), debido a su facilidad de uso, el rango de masas que cubre, y la buena linealidad, resolución y calidad de los espectros de masas que produce. Consiste en 4 barras paralelas de sección hiperbólica o circular, en las cuales las opuestas están conectadas eléctricamente 2 a 2 y a las cuales se les aplica una radiofrecuencia. Los iones pasan a través de esta estructura y se les induce un movimiento oscilatorio que hace que describan una trayectoria en espiral, que selecciona unos iones dejándolos llegar hasta el detector, mientras que el resto colisionan con las barras. El uso del modo SIM (*Single Ion Monitoring*) proporciona la mayor sensibilidad para iones o fragmentos específicos, ya que le dedica más tiempo a cada masa en lugar del *Full Scan*, que produce un barrido completo entre rangos de iones.

El *Tiempo de Vuelo* (TOF) (Figura 2.2 b), es una técnica que está creando mucho interés en el análisis de residuos de herbicidas [6]. Consiste en un tubo de

aproximadamente 1 m de largo. Los iones se forman en pulsos cortos y se aceleran en el tubo con un potencial de unos cuantos miles de voltios. Si se les da igual energía cinética, los iones de masas diferentes viajan a diferentes velocidades. Los iones más ligeros son acelerados, mientras que los iones más pesados van detrás. El tiempo de llegada de los iones al detector se convierte en un valor de masa mediante una sencilla ecuación. El analizador proporciona un espectro de masas completo con cada pulso de ionización de la fuente. Los iones son empujados al analizador proporcionando datos de adquisición muy rápidos, de 500 espectros por segundo, y, por tanto, una mayor resolución y exactitud en la masa que los espectrómetros convencionales, por lo que necesitan menos iones característicos para confirmar inequívocamente la identidad de un analito. Puede proporcionar la masa exacta para confirmar los espectros obtenidos y elucidar estructuras además de detectar analitos buscados (*target*) y no buscados (*non-target*), usando los múltiples iones que proporciona, los ratios de los iones y los espectros. Se utiliza un algoritmo de deconvolución de picos para no perder información espectral.

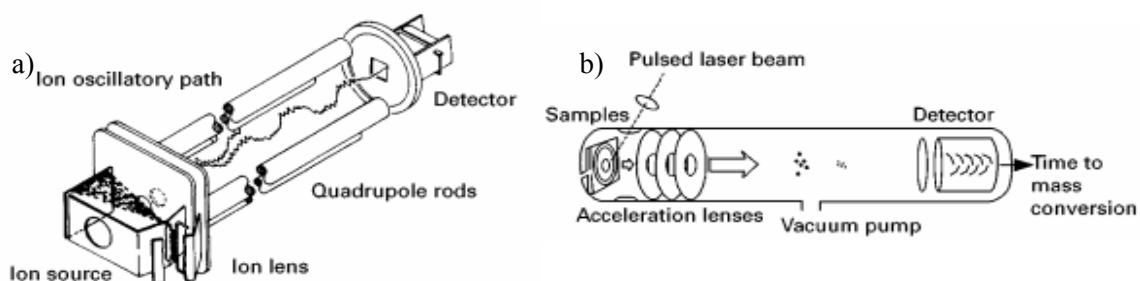


Figura 2.2. Representaciones esquemáticas de a) un cuadrupolo, y b) un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

Cromatografía de Líquidos (LC)

Las tendencias en el análisis de residuos de herbicidas dependen de las nuevas clases de productos que se generan para su uso comercial. La mayoría de herbicidas modernos son polares, poco volátiles o térmicamente inestables y no pueden analizarse por GC, de forma que LC se convierte en la técnica escogida.

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) consiste en un recipiente para la fase móvil líquida, una bomba, un inyector, una columna cromatográfica, y un detector. El tipo y la composición de la fase móvil influyen en la separación de los analitos.

La presencia de analitos en el efluente se detecta por un cambio en el índice de refracción, por la absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) a una determinada longitud de onda, por fluorescencia mediante excitación con la longitud de onda adecuada, por respuesta electroquímica, o mediante la información estructural proporcionada por MS. El detector UV-Vis destaca por su universalidad, ya que son muchos los analitos que poseen algún grupo cromóforo que absorbe en el intervalo de longitudes de onda entre 190-600 nm, en el cual trabajan la mayoría de los detectores. La utilización de un ***Detector de Diodo Array (DAD)*** supone muchas ventajas, como son la visualización del espectro UV-Vis en todo momento del análisis, la determinación del máximo de absorbancia para todos los analitos, la identificación de compuestos en función de las longitudes de onda de absorción, y la determinación de la pureza del pico. Sin embargo, muchas veces su aplicación en el análisis de residuos de herbicidas se ve dificultada

porque le afectan mucho las interferencias producidas por los co-extractos presentes en la muestra haciendo que la confirmación inequívoca rara vez sea posible [7].

Como consecuencia de los problemas de identificación con DAD, LC-MS/MS está ganando mucha aceptación en el análisis de herbicidas ya que ofrece la posibilidad de confirmaciones inequívocas y una cuantificación exacta, eliminando los problemas que presentan otros detectores en LC. El detector de MS/MS puede tener varias configuraciones, siendo la más usual de 3 cuadrupolos en línea. Sin embargo, las respuestas de los analitos dependen mucho del tipo de interfase usada para eliminar la fase móvil que entra desde la columna e introducir los analitos en el detector.

La **Ionización por Electrospray** (ESI, *Electrospray Ionization*) (Figura 2.3) es una técnica de ionización suave, en la que se forman menos fragmentos que en EI. Los iones de la muestra procedentes de la disolución a la salida del capilar de separación son transferidos desde una fase condensada a una fase gaseosa. La muestra procedente del capilar de separación, y con la ayuda de un gas nebulizador, se transforma en una nube de gotas cargadas y dispersas que son sometidas a un gradiente de potencial antes de llegar al MS. El disolvente que sale de la columna se va evaporando de las microgotas formadas, mediante la aplicación de un flujo de gas “de secado” (nitrógeno caliente) en la cámara de ionización. Las microgotas se van dividiendo en otras aún más pequeñas debido a las repulsiones electrostáticas que se producen entre ellas (repulsiones de Coulomb). Así los iones pasan a la fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del MS debido al voltaje aplicado. Al final del proceso, se obtienen iones mono o multicargados, que son transferidos al sistema óptico del MS, zona en la que los iones son transportados al analizador de masas y posteriormente al detector.

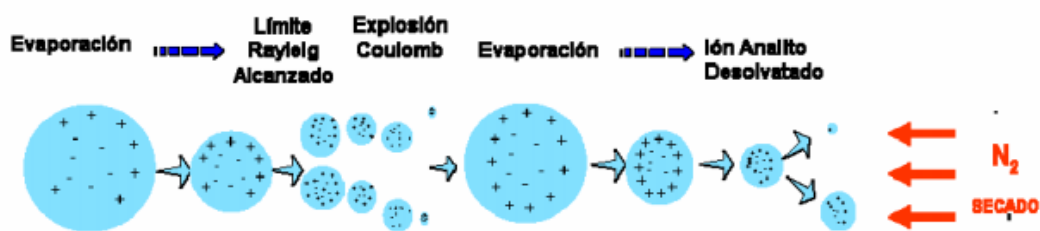


Figura 2.3. Proceso de ionización por ESI.

2.1.1.2. Otras Técnicas

Existen otras técnicas para el análisis de residuos de herbicidas, aunque todavía son minoritarias respecto de las cromatográficas. En general, las tendencias actuales en el análisis de residuos son hacia el aumento de la velocidad de los análisis mediante las técnicas *fast*, el desarrollo de los métodos “in situ”, y la automatización.

Dentro de las técnicas electroforéticas, la electroforesis capilar (CE) y la electroforesis capilar de zona (CZE), son las más empleadas para el análisis de residuos de herbicidas. Se basan en la migración diferencial de especies cargadas en presencia de un campo eléctrico en un capilar lleno de un medio electroforético. Su poca flexibilidad, sensibilidad, las limitaciones en la detección y la disponibilidad de otros métodos cromatográficos, han hecho que se usen únicamente en algunas determinaciones de herbicidas iónicos en muestras medioambientales, como por ejemplo, triazinas y sulfonilureas [8].

Los métodos no cromatográficos para la detección de residuos de herbicidas consisten en una amplia variedad de técnicas. Pueden basarse en métodos “biológicos” o “físicos”. Las técnicas biológicas incluyen el Inmunoensayo, los Biosensores, los Ensayos Enzimáticos y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Entre las físicas, están la Espectrofotometría y la Voltametría.

Las técnicas basadas en inmunoensayos, como por ejemplo, la técnica ELISA, operan en el mismo rango de LD que GC con detectores específicos, pero con costes mucho más reducidos. Los inmunoensayos se han desarrollado para una amplia variedad de herbicidas en diferentes matrices, como por ejemplo, Trifluralina en suelo, agua y alimentos [9,10], triazinas en suelo [11,12], y sulfonilureas [13]. Sus inconvenientes consisten en la falta de reproducibilidad, la poca sensibilidad frente a las técnicas cromatográficas, además de su poca utilidad para métodos multirresiduo.

Existen también inmunosensores, formados por un elemento biológicamente sensible (llamado inmunosensor, por ejemplo un enzima) asociado a un transductor, que convierte la señal biológica en una señal medible físicamente. Su principal ventaja consiste en que generan la señal directamente, potenciando su uso para el control medioambiental “in situ” y a tiempo real. Sin embargo, por ahora están muy limitados a ciertos analitos en unas pocas matrices, como por ejemplo, el análisis de 2,4-D por bioluminiscencia [14], o mediante un biosensor basado en la actividad combinada de las enzimas alcalina fosfatasa y glucosa oxidasa [15].

2.1.2. ANALITOS

Habitualmente el carácter de confidencialidad de los datos de venta de herbicidas de las casas comerciales no permite precisar cuales son los más utilizados y en que cantidades se distribuyen en la zona de estudio. Debido a esto, se escogieron, para este estudio, los principales herbicidas que representan las familias más utilizadas en los cultivos de cebada (Figura 2.4, Tabla 2.1) [16,17].

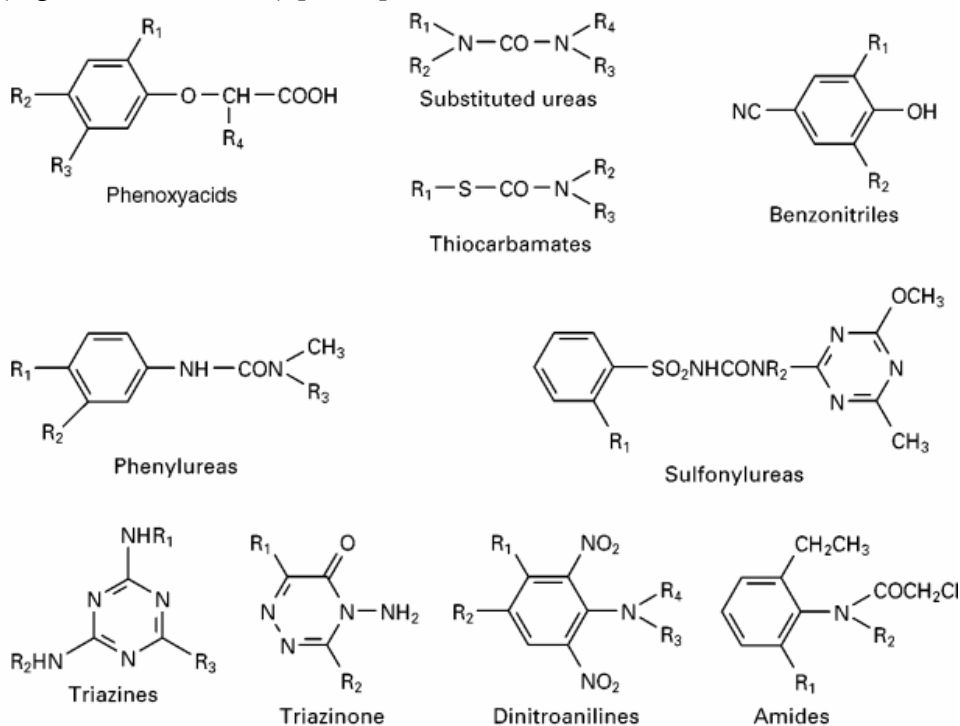


Figura 2.4. Estructuras químicas de las principales familias de herbicidas.

Las 5 propiedades físico-químicas fundamentales de los herbicidas que determinan su transporte entre las fases en la separación analítica son: la presión de vapor, la solubilidad, el peso molecular, la hidrofobicidad (coeficiente de partición octanol/agua) y la constante de disociación ácida [18] (Tabla 2.1). Debido a la gran diversidad de herbicidas escogidos para este estudio, y en función de sus propiedades que influyen en su análisis, se separaron los herbicidas en tres grupos:

- **Grupo I:** compuestos que se analizan directamente por GC,
- **Grupo II:** compuestos poco volátiles y térmicamente inestables que se cuantifican por GC utilizando sus productos de degradación térmica y,
- **Grupo III:** compuestos poco volátiles y térmicamente inestables que necesitan una etapa de derivatización previa a su análisis por GC.

Varias materias activas se retiraron a lo largo del desarrollo de este estudio, en virtud de la Resolución de 30 de junio de 2003, de la Dirección General de Agricultura, por la que se publican las fechas y plazos para la retirada del mercado de productos fitosanitarios que contengan sustancias activas excluidas de la Lista Comunitaria, regulada por la Orden APA/1610/2003 [17]. La retirada está regulada por el Reglamento CE 2076/2002, de 20 de noviembre (DOCE, Diario de las Comuidades Europeas, 23/11/02).

Aun así se mantuvo su análisis y extracción, ya que podían seguir encontrándose en los suelos agrícolas debido a que su uso estaba todavía autorizado durante cierto tiempo. Se trata de:

1. La Cianazina: Con plazo máximo de utilización a 30 de septiembre de 2003, y plazo límite para comercialización de existencias fijado a 31 de julio de 2003.
2. El Metoxuron y la Terbutrina: Con plazo máximo de utilización a 31 de diciembre de 2003, y plazo límite para comercialización de existencias fijado a 31 de octubre de 2003.

Tabla 2.1. Propiedades de los Herbicidas de estudio [19,20]. B, Punto de Ebullición, P.I. Patrón Interno. p¹ Se refiere al isómero para.

Grupo	Nº	Analito	Familia	Fórmula Molecular	Peso Mol.	log Kw	pKa (25°C)	Sol. H ₂ O (mg/l, 20°C)	Presión vapor (mPa, 25°C)	Punto de Fusión
I	1	Cianazina	Triazina	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	240,7	2,10	0,63	171	0,000213	167,5-169
	2	Terbutilazina	Triazina	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229,7	3,21	2,00	8,5	0,15	177-179
	3	Terbutrina	Triazina	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241,4	3,65	4,30	22	0,225	104-105
	4	Metribuzina	Triazinona	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	214,3	1,65		1165	0,000000121	125,5-126,5, B 132
	5	Carfentrazona etil	Triazinona	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O ₃	412,2	3,36		22	0,072	B 350-355
	6	Prosulfocarb	Tiocarbamato	C ₁₄ H ₂₁ NOS	251,4	4,65		13,2	6,9	B 129
	7	Trialato	Tiocarbamato	C ₁₀ H ₁₆ Cl ₃ NOS	304,7	4,66		4	16	B 117
	8	Pendimetalina	Dinitroanilina	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281,3	5,18	2,80	0,33	1,94	54-58
	9	Trifluralina	Dinitroanilina	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335,3	5,27		0,221	9,5	B 139-140
	10	MCPA tioetil	Éster Fenoxiácido	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂ S	244,7	4,05			21	B 165
	11	Flamprop isopropil	Éster ariaminopropiónico	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363,8	3,69		12	0,085	72,5-74,5
	12	Fenoxaprop p ¹ etil	Éster Ariloxifenoxipropiónico	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	361,8	4,58		0,7	0,00053	89-91
	13	Diclofop metil	Éster Ariloxifenoxipropiónico	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	341,2	4,60		0,8	0,25	39-41
	14	MCPP isooctílico	Éster Fenoxiácido	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₃	327,6					
	15	Bromoxinil octanoato	Hidroxibenzonitrilo	C ₁₅ H ₁₇ Br ₂ NO ₂	403,0	5,40			1	45-46
	16	Ioxinil octanoato	Hidroxibenzonitrilo	C ₁₅ H ₁₇ I ₂ NO ₃	497,1	6,12		< 0,05	1	59-60
	17	Diflufenican	Nicotinalida	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	394,3	4,90		0,05	0,0042	161-162
	18	Bifenox	Nitrofeniléter	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO ₅	342,1	4,48		0,35	0,32	84-86
	19	Mefenpir dietil		C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₄	373,2	3,83		20	0,0063	
	20	Tralkoxidim	Oxima	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	329,4	2,10	4,30	6,1	0,00037	106
	21	Metabenzotiazuron	Urea	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	221,3	2,64		60	0,0059	119-121
II	22	Amidosulfuron	Sulfonilurea	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₇ S ₂	369,4	1,63	3,58	9	0,0103	160-163
	23	Tribenuron metil	Sulfonilurea	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₆ S	395,4	0,78	4,70	2040	0,000053	141
	24	Metoxuron	Fenilurea	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	228,7	1,60		678	4,3	126-127
	25	Isoproturon	Fenilurea	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206,3	2,50		70,2	0,00505	158
	26	Clortoluron	Fenilurea	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	212,7	2,50		74	0,005	148,1
	27	Linuron	Fenilurea	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249,1	3,00		63,8	5,1	93-95
	III	28	Dicamba	Derivado del ácido benzoico	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221,0	0,55	1,87	5500	4,5
29		2,4-D	Fenoxiácido	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	225,7	-0,83	2,87	44558	0,0187	140,5
30		MCPP	Fenoxiácido	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214,6	0,64	3,11	250000	1,6	94-95
31		Diclorprop p ¹	Fenoxiácido	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235,1	-0,56	3,67	590	0,18	122
32		MCPA	Fenoxiácido	C ₉ H ₉ ClO ₃	200,6	2,80	3,73	294000	0,0023	119-120,5
33		Fenoxaprop p ¹	Ácido Ariloxifenoxipropiónico	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	333,8	1,83	4,60			
34		Diclofop	Ácido Ariloxifenoxipropiónico	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	326,2		3,60			
35		Flamprop	Ácido ariaminopropiónico	C ₁₆ H ₁₃ ClFNO ₃	221,0	2,90	3,70	18,2	0,000239	
36		Bromoxinil	Hidroxibenzonitrilo	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	276,9	1,04	3,86	0,17	90	194-195
37		Ioxinil	Hidroxibenzonitrilo	C ₇ H ₃ I ₂ NO	370,9	2,20	4,10	3034	0,00204	212-213
P.I.		Alacloro	Cloroacetanilida	C ₁₂ H ₂₀ ClNO ₂	269,8	2,10				

2.1.2.1. Grupo I: Directamente analizables por GC

Debido a que una explicación detallada de las características de cada herbicida de estudio haría muy extensa esta parte de la memoria, se han detallado únicamente las características de las familias más importantes analizadas.

Dinitroanilinas

Sus propiedades herbicidas se conocen desde la década de los cincuenta. Se empezaron a comercializar en 1961, y algunas, como la Trifluralina, son muy empleadas. Su espectro de acción es muy amplio, tanto sobre gramíneas como sobre dicotiledóneas, por lo que se trata de los herbicidas de absorción radicular más usados en el cultivo de cereales. Su mecanismo primario de acción es la inhibición de la división celular y al poco tiempo de ser aplicado se observa, en especies sensibles, alteraciones en los procesos metabólicos.

Los compuestos son de color amarillo intenso debido a la presencia de dos grupos nitro en el anillo. Se basan en su enlace anilínico y son moléculas neutras. Además son volátiles y sensibles a la luz, descomponiéndose rápidamente en multitud de productos cuando son expuestos a ésta [21]. Son moderadamente persistentes en el suelo hasta una estación completa tras su aplicación, siendo sus principales pérdidas causadas por volatilización o lixiviación.

Se analizan típicamente por GC, debido a su elevada volatilidad y estabilidad en disolventes orgánicos [22], aunque también pueden analizarse por LC. También se ha descrito su análisis por polarografía de pulso diferencial [23].

Éteres difenílicos

Son herbicidas que se absorben por raíces, tallos y hojas, aunque su traslocación es limitada y actúan provocando desorganizaciones en las membranas celulares. Necesitan luz para activarse, y su acción es rápida (1-2 días). Son herbicidas sistémicos y de contacto, que se usan para el control selectivo de las hierbas de hoja ancha en una amplia variedad de cultivos, entre los que se incluyen los cereales.

Contienen un difenil eter en su estructura. No son volátiles, son generalmente lipofílicos e insolubles en agua.

Tiocarbamatos

Son herbicidas con un periodo de actividad corto (hasta 6-8 semanas). Controlan sobre todo a gramíneas anuales y dicotiledóneas, además de afectar a malas hierbas perennes. Se absorben por la raíz pero se traslocan por el xilema y llegan hasta el coleóptilo, inhibiendo su crecimiento.

Son líquidos por lo general amarillentos y de olor desagradable. Son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Poseen, en general, una elevada tensión de vapor, por lo que son muy volátiles.

Los residuos de los herbicidas pertenecientes a este grupo, se determinan principalmente por GC ya que son térmicamente estables, aunque las técnicas de LC son igualmente aplicables [24]. El ECD proporciona elevadas respuestas, sobre todo con los analitos que contienen halógenos pero en los últimos años el MS ha desbancado a los otros detectores para confirmar o como técnica de rutina debido a la buena sensibilidad obtenida en modo SIM [5].

Triazinas

Es una de las familias más importantes de herbicidas. Tiene su origen en el descubrimiento de la clorazina realizado en los laboratorios de la compañía suiza Geigy en 1955, apareciendo posteriormente otros compuestos análogos. Su uso está muy extendido, llegando a representar el 30% del total de herbicidas utilizados [25]. Se emplean en numerosos cultivos, sobre todo de cereales, aplicadas en preemergencia y/o postemergencia para el control de malas hierbas anuales. Se adsorben por las raíces y se traslocan hasta las hojas donde ejercen su actividad herbicida inhibiendo la fotosíntesis.

Son sólidos cristalinos de color blanco, no volátiles. En condiciones normales son estables, pero se hidrolizan en medio alcalino o ácido, especialmente cuando se eleva la temperatura [26]. La estructura de las triazinas está compuesta por heterociclos hexagonales con tres átomos de nitrógeno y tres cadenas diferentes unidas a ellos por medio de los carbonos intermedios. Las triazinas simétricas pueden dividirse en cloro-triazinas, metoxitriazinas o metiltiotriazinas, en función del grupo sustituido en la posición 2. Su basicidad, depende de sus sustituyentes: $-Cl < -SCH_3 < -OCH_3$ [27]. Los otros dos carbonos, están sustituidos con grupos amino. Las triazinas asimétricas se denominan triazinonas.

Debido a su amplio uso, su estabilidad, su movilidad y su solubilidad en agua, es muy importante controlarlas ya que están muy extendidas en el medio ambiente. Son poco tóxicas para los animales superiores, pero su toxicidad no es totalmente despreciable [28]. Algunas, como la Atrazina, se han clasificado como posible carcinógeno para los humanos y su uso se ha prohibido en los países europeos [25].

Se determinan principalmente por GC [29,30], aunque también se han determinado frecuentemente por HPLC con detección UV ya que absorben a 220 nm - 240 nm [31]. Otras posibilidades incluyen la cromatografía con fluidos supercríticos (SFC), aunque se han publicado pocas aplicaciones. También se ha estudiado el potencial de otras técnicas como CZE. Recientemente se ha descrito una técnica de análisis rápido que describe ionización por nano-electrospray acoplada a electroforesis en fase gaseosa (GPE) [5].

2.1.2.2. Grupo II: Termolábiles. Análisis por GC de sus Productos de Degradación Térmica

Uno de los grupos más importantes lo constituyen los herbicidas derivados de la Urea. Fueron desarrollados en 1970 para el control de malas hierbas en cultivos de cereales, constituyendo uno de los grupos de herbicidas más antiguos usados en agricultura. Dentro de ellos están las Fenilureas, empleadas desde los años 50, y las Sulfonilureas, desarrolladas más recientemente con dosis de aplicación muy pequeñas, debido a su alta efectividad [32].

Para la determinación de herbicidas de urea se han usado varias técnicas. En general, la técnica más utilizada para su análisis es HPLC con detección UV ya que todos tienen máximos de absorción entre 220-232 nm [33]. Pero debido a que la sensibilidad obtenida no es adecuada y a la falta de selectividad, el LC-(ESI)-MS/MS se ha convertido en la técnica más adecuada [34-40].

GC también proporciona una elevada sensibilidad y selectividad con detectores selectivos sobre todo si tienen átomos halogenados, aunque actualmente es MS el más usado para muestras medioambientales [5]. Sin embargo la inestabilidad térmica de sus dos subgrupos, hace necesario preparar primero derivatizados estables (principalmente

metilos, heptafluorobutirilos o pentafluorobencilos), o usar productos de degradación térmica específicos para su análisis por GC [41].

Sulfonilureas

Controlan sobre todo malas hierbas de hoja ancha en cultivos de cereales y se aplican en post-emergencia. Se absorben por raíces y hojas, y se traslocan con facilidad actuando mediante la inhibición de la síntesis de aminoácidos [33].

Están basadas en la estructura general: $R_1-SO_2-NH-CO-NH-R_2$ [33]. No son volátiles y se comportan como ácidos débiles, por lo que existen en forma iónica en la mayoría de los suelos agrícolas y están mínimamente adsorbidos en los coloides del suelo. Se comercializan en forma de ésteres pesados o sales que se hidrolizan.

Debido a su solubilidad en agua pueden lixiviarse. Son muy fitotóxicas y presentan poca selectividad [28]. Las sulfonilureas se aplican a dosis bajas y son poco tóxicas para los mamíferos [28,42].

No pueden analizarse directamente por GC debido a que sufren ruptura térmica en su enlace aminoácido, por lo que se han descrito distintas reacciones de derivatización:

- Con diazometano [43,44].
- Con bromuro de pentafluorobencilo (PFBBr) y etil piperidina [45], con el problema de la falta de especificidad para herbicidas ya que aparecen interferencias del suelo que forman los mismos derivatizados con el PFBBr [33].
- Por hidrólisis seguida del análisis de las correspondientes aril sulfonamidas [46].

Estas reacciones no han sido demasiado aceptadas debido a sus resultados poco satisfactorios, por lo que se ha planteado el uso de sus productos de degradación térmica para su análisis por GC ya que son específicos y adecuados para cuantificar [37].

También se ha descrito el uso de otras técnicas, como ELISA [33], CZE con detección UV [47], y CE para el análisis de suelos, pero el pequeño volumen de inyección usado no proporciona límites adecuados [48,49].

Fenilureas

Las primeras metoxiureas, como el Linuron, se usaron como herbicidas en 1960. El Metabenzotiazuron se comenzó a utilizar en 1966 y la actividad herbicida del Clortoluron fue descrita por primera vez en 1969. Normalmente se aplican al suelo y son absorbidas por las raíces, aunque también presentan actividad foliar con la ayuda de surfactantes. El mecanismo de acción es similar al de las triazinas aunque además de inhibir la fotosíntesis, también pueden desorganizar membranas celulares. Algunos pueden emplearse como herbicidas totales, aunque en general se emplean como herbicidas selectivos en pre y post-emergencia. Son muy fitotóxicas y presentan poca selectividad [28]. Están reemplazando a las triazinas ya que se degradan más fácilmente y se usan en menores dosis [50]. A diferencia de las dimetilureas, presentan menor persistencia en el suelo y mayor selectividad. Su amplio uso agrícola, su toxicidad y su posible efecto carcinogénico han estimulado el desarrollo de métodos para su detección a bajas concentraciones en agua, suelos y material vegetal.

Son derivados neutros de la urea, un conocido fertilizante, a la que se le sustituyen tres de sus hidrógenos por diversos radicales. Son sólidos blancos, químicamente estables, poco volátiles y poco solubles en agua, resultando muy persistentes en el suelo al ser adsorbidos por la arcilla y por el humus. No se hidrolizan apreciablemente en

disoluciones acuosas neutras a temperatura ambiente pero se descomponen en medios ácido o básico y en caliente [28]. Su máximo riesgo radica en la aplicación de dosis demasiado altas ya que su gran persistencia en el suelo puede perjudicar a los cultivos siguientes. Se descomponen por la acción microbiana por eso la materia orgánica facilita su descomposición. Son poco tóxicas para los animales superiores. El Isoproturon está considerado por la OMS (2004) como una sustancia poco tóxica para los mamíferos pero peligroso para los sistemas acuáticos.

Se han descrito diferentes reacciones de derivatización para su análisis por GC:

- Formación de heptafluorobutirilos [51].
- Derivatización con Acetanhidrido [52].
- Derivatización con Cloruro de Dansyl para conseguir un metabolito fluorescente y analizarlo por LC con detector de fluorescencia [53].
- Fotólisis previa con una lámpara UV (254 nm) para convertirlas en sus monoalquilaminas y posteriormente derivatizarlas con o-ftaldehído y a-mercaptoetanol para producir isoindoles fluorescentes [54,55].

El análisis directo de estos compuestos por GC no es aconsejable debido a su inestabilidad térmica que produce una extensa y poco reproducible formación de isocianatos y aminas en los sistemas de inyección en *splitless* que trabajan a altas temperaturas [41]. Sin embargo, un cuidadoso control de las condiciones de inyección, como la temperatura del *inlet*, la presión y la presencia de aditivos químicos, como el ácido acético, pueden minimizar la descomposición térmica facilitando el análisis de las fenilureas por GC y, conducir a la conversión reproducible en isocianatos [56] que hace que no sea necesaria la derivatización [37].

También se han descrito otras técnicas, como ELISA para Isoproturon [57], un microelectrodo de fibra de carbono para la determinación electroanalítica de Linuron con resultados comparables a HPLC en suelos [58], y la detección UV para su determinación en suelos [59].

2.1.2.3. Grupo III: Polares. Análisis por GC previa Derivatización

Fenoxiácidos

Se les llama fitohormonas de síntesis y constituyen el grupo más antiguo de herbicidas sintéticos (introducidos en 1940). Se usan ampliamente para el control de malas hierbas de hoja ancha y otra vegetación, ya que son relativamente baratos y muy potentes a bajas concentraciones [60]. Se aplican principalmente en post-emergencia en cultivos de cereales, como el trigo y la cebada. Funcionan de forma similar a las fitohormonas del tipo de las auxinas; por ello, también se denominan herbicidas reguladores del crecimiento. Se adsorben rápidamente por el follaje y se traslocan bien, pudiendo llegar hasta las raíces.

Estos herbicidas ácidos constan de varias familias de compuestos relacionados por sus similitudes químicas que influyen en la manera en que se extraen y analizan. Son productos derivados de grupos funcionales ácidos que incluyen el ácido benzoico (Dicamba), el ácido acético (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D, y el ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético, MCPA), y el ácido propanoico (Diclorprop, Diclofop, Fenoxaprop, y el ácido 2-(4-cloro-2-metilenoxi) propanoico acid, mecoprop, MCP), entre otros [60].

Son estables en condiciones normales pero se hidrolizan lentamente con los ácidos y las bases en caliente y también por acción de la luz [26].

Su determinación en los cultivos y en los suelos es muy importante ya que tienen efectos indeseables sobre la microflora del suelo cuando no se degradan lo suficientemente rápido además de contaminar las aguas subterráneas por su alta solubilidad [61]. Presentan un marcado efecto subletal, ya que a dosis muy inferiores a las recomendadas afectan al crecimiento de especies sensibles. Debido a la sensibilidad de ciertos cultivos frente a estos productos, su empleo está restringido y regulado en numerosos países para evitar problemas de derivas en las proximidades.

Hidroxibenzonitrilos

Los hidroxibenzonitrilos son herbicidas conocidos y apreciados por sus características inigualables en términos de eficacia en la lucha contra las dicotiledóneas en los cereales. Tienen acción foliar y de contacto, por su limitada traslocación, e inhiben la fotosíntesis. Se emplean en trigo y cebada para el control de las malas hierbas dicotiledóneas, combinándose frecuentemente con 2,4-D, MCPP y MCPA para completar su espectro y mejorar el control de malas hierbas resistentes a los herbicidas hormonales.

Los principales compuestos de este grupo son el Bromoxinil y el Ioxinil, cuyas moléculas contienen el grupo nitrilo y tienen una estructura química similar, excepto en los dos átomos de bromo en el primero, sustituidos por sendos átomos de yodo en el segundo.

Son relativamente poco tóxicos, correspondiéndose su mayor toxicidad con su estructura de nitrilo.

Análisis

Los herbicidas ácidos pueden aplicarse en forma de ácidos libres, ésteres y sales [54]. Las sales son hidrolubles y poco volátiles. Los ésteres son insolubles en agua, aunque solubles en disolventes orgánicos y volátiles. Diferentes estudios han demostrado que los herbicidas ácidos formulados en forma de ésteres y sales, sufren una rápida hidrólisis en el medio ambiente y en los tejidos vegetales en 24-48 horas, en función del pH, de la presencia de tejidos vegetales y bacterias del suelo, produciendo como resultado los ácidos o los fenoles libres, que además suelen estar en su forma ionizada a la mayoría de pH medioambientales [32,60,62,63]. Esto implica que deben evaluarse ambas formas, el éster y el ácido, o bien convertir todos los componentes a su forma de ácido con una hidrólisis básica antes de su derivatización para su posterior análisis por GC [60,62]. Sin embargo, esta aproximación es inadecuada para los métodos de análisis multiresiduo ya que otros analitos serían destruidos en estas condiciones, por lo que se propuso en este estudio, el análisis simultáneo de los ésteres y sus correspondientes ácidos.

Los compuestos ácidos, normalmente se analizan por HPLC pero necesitan la formación de un par iónico [64]. Debido a su naturaleza polar, presentan picos asimétricos y con colas cuando se analizan por GC y, por tanto, es esencial enmascarar sus hidrógenos activos por medio de reacciones de derivatización para dar lugar a productos con suficiente volatilidad [65].

Las reacciones típicas de derivatización de estos compuestos son la sililación, la alquilación y la alquilación pirolítica [66]. La sililación se considera inadecuada para análisis de trazas ya que la sensibilidad que se consigue con los derivatizados silil no es muy alta [65].

Existen muchos reactivos diferentes para producir derivatizados alquilados, siendo el diazometano, los haluros, alcoholes y alcoholes halogenados los más usados [67]. El

diazometano es el reactivo derivatizante más usado para la derivatización de fenoxiácidos [65]. Se usa en los métodos EPA 515.3, *Extraction of Chlorinated Acids from Water*, y EPA 8185A, *Chlorinated Herbicides by GC using Methylation or Pentafluorobenzoylation Derivatization*. Sin embargo, requiere una preparación de la muestra muy laboriosa y además conlleva riesgos debido a su toxicidad, carcinogenicidad y peligro de explosión, por lo que es recomendable buscar vías alternativas. El método EPA 8185A propone el uso de PFBBBr que reacciona con los grupos hidroxilo, amino y carboxilo, para formar derivados pentafluorobencilados, moléculas mucho más pesadas que se analizan por GC, pero la formación de estos compuestos derivatizados es complicada ya que necesita una limpieza con sílica previa a su análisis por GC [68].

La metilación suele escogerse ya que los ésteres metílicos se preparan fácilmente, proporcionan rendimientos lo suficientemente altos y reproducibles, y tienen tiempos de retención en GC relativamente cortos [50,69].

Existen una serie de reactivos de alquilación pirolíticos (sales e hidróxidos de trimetilfenilamonio, tetrametilamonio, hidróxido de trimetilanilina e hidróxido de trimetilsulfonio, TMSH) que proporcionan metilaciones adecuadas por pirólisis de las sales previamente formadas a partir de nucleófilos, ácidos carboxílicos y fenoles. El reactivo de este tipo más usado es el TMSH ((CH₃)₃SOH) [70]. Fue introducido en 1979 como un agente suave de metilación para moléculas orgánicas ácidas ya que dona grupos metilo [71]. Disuelto en metanol genera un pH fuertemente alcalino, siendo estable varios meses si se almacena por debajo de 10°C [70]. Puede usarse de dos maneras, para metilar ácidos libres por pirólisis de la sal previamente formada en el sistema de inyección caliente del GC, o para catalizar la trans-esterificación de otros ésteres a ésteres metílicos [71].

Su uso proporciona ventajas adicionales frente a los otros procedimientos de metilación. Una ventaja importante es su facilidad para preparar los derivatizados sin necesidad de extracciones, limpiezas o tratamientos adicionales. No es necesario eliminar el exceso de reactivo, como en otros procedimientos, porque los productos formados son dimetil sulfuro, con un punto de ebullición de 37°C y metanol, que eluyen con el pico del disolvente y no interfieren en la separación cromatográfica de los analitos. Además, su uso frente a otros reactivos de alquilación pirolíticos es ventajoso, ya que sus sales se descomponen a temperaturas menores, aproximadamente 200°C [72]. En conclusión, esta reacción de derivatización es muy elegante y adecuada, ya que únicamente necesita añadir el reactivo a la muestra y la reacción se produce rápidamente en el inyector [71,73]. Debido a esto, fue la reacción escogida para su optimización con vistas a derivatizar los herbicidas ácidos estudiados y posibilitar así su análisis por GC.

2.1.3. MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN

La optimización de un método analítico puede llevarse a cabo de modos diferentes, bien de forma tradicional mediante el método de ensayo y error, o bien mediante diseños sistemáticos.

El modo tradicional univariante es quizás el que surge de forma más intuitiva. Consiste en variar un factor cada vez. A partir de unas condiciones iniciales, se realizan experimentos en los cuales todos los factores se mantienen constantes excepto el que se está estudiando. De este modo, la variación de la respuesta se puede atribuir a la variación del factor, y, por tanto, revela el efecto de ese factor. Esta estrategia

experimental presenta inconvenientes importantes cuando existen interacciones entre factores y además no proporciona la posición del óptimo.

La metodología multivariante utiliza la aplicación de diseños experimentales. El diseño estadístico de experimentos proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente, y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia, además de garantizar la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtienen [74]. Esto hace posible resolver circunstancias que no son explicadas adecuadamente por los métodos tradicionales, como aquellas en las que la respuesta analítica es una función multimodal, o cuando los efectos de las variables no son aditivos, sino que hay interacción entre ellos.

Por tanto, el diseño estadístico de experimentos implica:

1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo.
2. Identificar aquellos factores que pueden influir en el resultado de un experimento y el dominio experimental de interés.
3. Elegir el conjunto de experimentos a realizar, de modo que se minimicen los efectos de los factores no controlados.
4. Utilizar el análisis estadístico para estudiar los efectos de los diferentes factores implicados.

En los últimos años, ha surgido un método sistemático llamado diseño factorial que se ha usado de manera muy eficiente, especialmente cuando el número de variables a ensayar es muy grande y sus interacciones son muy importantes. Un inconveniente de estos diseños es el gran número de experiencias que necesitan cuando se ensayan varias variables. Sin embargo, el número de experimentos puede reducirse considerablemente con el uso de diseños factoriales fraccionados, como los diseños ortogonales. Se trata de estrategias de ahorro de tiempo y esfuerzo que implican el uso de un experimento diseñado estratégicamente de tal forma que introduce cambios deliberadamente para poder identificar los factores que afectan al procedimiento y estimar los valores que producen la respuesta óptima. El conocimiento previo de las variables, la experiencia y la intuición son muy útiles a la hora de definir los factores y los niveles a experimentar, ya que los diseños ortogonales solo cubren una región definida [75].

Los diseños de Taguchi son una variante que utiliza diseños ortogonales además de introducir el concepto de señal-ruido para evaluar la variación de la respuesta alrededor del valor medio debido al ruido experimental, lo que hace robusto al método contra los factores incontrolados [76].

2.1.4. EFECTO MATRIZ

La respuesta de algunos sistemas a determinados analitos puede estar afectada por la presencia de co-extractos de la matriz. Se observan incrementos o disminuciones en la respuesta del detector comparada con la obtenida por la simple dilución del analito en disolvente [77]. Los resultados analíticos en la cuantificación de trazas pueden sobrestimarse o minusvalorarse seriamente si este efecto matriz no es adecuadamente compensado [3].

Las estrategias utilizadas para disminuir o compensar el Efecto Matriz son:

1. La eliminación de los componentes de la matriz a través de limpiezas exhaustivas de los extractos, no suele ser útil en la práctica cuando se desarrollan métodos multirresiduo ya que se determinan herbicidas con un amplio rango de polaridades en matrices muy complejas y no es posible encontrar un método de limpieza

universal. Además, en algunos casos, el aumento en la respuesta producido por la matriz proporciona picos cromatográficos de mayor calidad [78].

2. El uso de fungibles desactivados en el sistema de inyección ya que sus sitios activos producen la mayor fuente de efectos matriz. Algunos herbicidas pueden interaccionar fuertemente con estos sitios activos en función de sus grupos funcionales, sobre todo grupos hidroxilo, amino, fosfato y otros relativamente polares, y, por tanto, disminuir su transferencia hacia la columna y dificultar su detección al producir un ensanchamiento de los picos [8]. Todas las piezas están desactivadas al principio pero con el uso se van activando y adsorben los analitos, sobre todo aquellos que forman puentes de hidrógeno.
3. El uso de métodos de inyección que eliminen los efectos de los sitios activos [79]. Entre las distintas técnicas de inyección que existen, la inyección en *splitless*, común en el análisis de trazas, produce algunas pérdidas de analitos y se encuentra afectada por el efecto matriz. El efecto matriz puede disminuirse significativamente mediante el uso del *pulsed splitless*, que utiliza un pulso de presión del gas portador durante la inyección, pero a concentraciones bajas de analitos, el efecto matriz puede seguir siendo muy importante [3].
4. El uso de calibrados preparados con extractos blancos de matriz (*matrix-matched calibration*) [80]. Estos extractos blancos de matriz se preparan de la misma manera que las muestras a analizar. Se fundamenta en que durante el análisis de muestras reales, la degradación y/o adsorción de los analitos se reduce en cierta medida debido al enmascaramiento de los sitios activos del *inlet* por los componentes de la matriz co-extraídos. De la misma manera, la respuesta de los analitos se incrementa en presencia de estos componentes si se compara con patrones preparados en disolvente puro. La calibración con blancos de matriz es preferida actualmente para minimizar la influencia de la matriz en la cuantificación [54,81].
5. El método de adiciones patrón se utiliza cuando no es posible obtener blancos de matriz. Mejora la cuantificación de los compuestos en la matriz pero requiere un esfuerzo extra ya que se necesita construir una recta de adiciones estándar para cada muestra a analizar, y puede ser inexacto ya que el efecto matriz depende de la concentración [78].
6. El uso de funciones de corrección características para cada analito y matriz calculados a partir de los resultados de la calibración en disolvente y en matriz. Los factores de corrección pretenden corregir las variaciones producidas por la matriz para eliminar la necesidad de usar calibrados con extractos blancos en el análisis rutinario [82]. Sin embargo, el uso de estos factores matemáticos ha demostrado no ser aceptable ya que el efecto es muy variable y muy dependiente de la estabilidad del equipo de análisis, además de aumentar la incertidumbre [78].
7. La adición de protectores de analitos es una alternativa a la preparación de calibrados en matriz para evitar la pérdida de analitos por adhesión a los sitios activos de la inyección. Son compuestos que añadidos al extracto antes de analizar, se unen a los sitios activos que retienen los herbicidas en la inyección permitiendo así que estos pasen en mayor medida a la columna cromatográfica. Se supone que simulan el efecto de los co-extraídos de la matriz por simple adición al calibrado en disolvente y sin necesidad de preparar calibrados en matriz [78].

De entre todas estas propuestas la más utilizada es el uso de calibrados en matriz y su uso es recomendado para extractos a los que no se ha aplicado una limpieza [54]. Se

utilizan para compensar el aumento en la respuesta observada para algunos herbicidas y evitar así una mala cuantificación [81,83]. En todo caso, no hay que olvidar que, aunque compensa el efecto de la matriz, no soluciona el problema de la cuantificación de herbicidas en extractos con muchos interferentes obtenidos a partir de una incorrecta metodología de limpieza, ya que el problema que lo produce sigue presente.

Diferentes muestras, tipos de extractos y concentraciones de matriz pueden mostrar efectos matriz de diferente magnitud. Debido a esto, la intensidad del efecto varía de una matriz a otra y también en función de la concentración de la misma [78], por lo que es necesario evaluar el efecto matriz con cada nueva muestra, lo que supone un esfuerzo muy grande. Si un pequeño error en la calibración es aceptable, se puede usar una matriz representativa como calibrado para un amplio rango de muestras diferentes. Por ejemplo, ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) considera que para incluir en el alcance de acreditación como tipo de ensayo “Análisis de residuos de plaguicidas por una técnica determinada en productos alimenticios” el laboratorio debe haber validado el método de ensayo con al menos 3 matrices representativas significativamente diferentes [84]. Con estos estudios se puede desarrollar una base de datos con los herbicidas afectados o no por la matriz y usarla como referencia para futuros análisis [81].

Las dos agencias más importantes de los Estados Unidos, la EPA y la FDA (*Food and Drug Administration*) no permiten el uso de los calibrados preparados en extractos blancos de matriz para la cuantificación de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos, ya que sostienen que pueden ser manipuladas para obtener los resultados deseados. Si acepta, sin embargo, el uso de protectores de analitos, como la gulonolactona o el ácido acético. Sin embargo, el Documento N° SANCO/10232/2006 de la Comisión Europea [77], apuesta por el uso de este método de cuantificación ya que está demostrado que las recuperaciones son excesivamente altas cuando se usan calibrados preparados en disolvente para cuantificar muestras reales [78,81].

2.1.5. OBJETIVOS

- Evaluar diferentes técnicas, HPLC-DAD, GC-AED y GC-MS, para estudiar cual es la más adecuada a las necesidades de las muestras que se van a analizar, y compararlas con PTV-GC-TOF/MS y LC-(ESI)-MS/MS, técnicas usadas durante una estancia en el Departamento de Plaguicidas y Contaminantes de RIKILT, Instituto de Seguridad Alimentaria, en Wageningen (Holanda).
- Optimizar los parámetros cromatográficos para desarrollar un método multiresiduo que permita el análisis del mayor número posible de herbicidas a la vez y con la mejor sensibilidad para alcanzar los límites menores posibles. Se seleccionan los herbicidas de estudio entre una amplia variedad de familias aplicadas en el cultivo de cebada ya que no se conoce el historial de tratamientos de las muestras procedentes del Programa de las Estepas Cerealistas, entre otras.
- Optimizar la reacción de derivatización de los herbicidas ácidos con TMSH mediante un diseño ortogonal.
- Estudiar el efecto matriz sobre calibrados preparados en extractos blancos de matriz mediante diferentes pruebas estadísticas.

2.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. REACTIVOS

Los disolventes orgánicos empleados para el análisis fueron de calidad cromatográfica y suministrados por Labscan (Dublin, Irlanda), al igual que el ácido acético glacial y el ácido fosfórico. El ácido fórmico (pureza > 98%) fue suministrado por Fluka (Buchs, Suiza).

El TMSH puro en metanol 0,25M, se adquirió en Fluka y se almacenó a 4°C y en oscuridad.

Los gases empleados fueron suministrados por Carburos Metálicos (Barcelona). Se utilizó Helio (C-50, 99,999% de pureza), Hidrógeno (C-50), Oxígeno (C-48) y Nitrógeno (Dewar).

2.2.2. ANALITOS

Todos los patrones de los herbicidas fueron de calidad certificada con una pureza mayor de 97% y suministrados por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). Las disoluciones concentradas madre (1000 mg/l) se prepararon en acetona y se almacenaron a -20°C y en oscuridad. Antes de utilizarlas se dejaba que se atemperasen 1 hora. Se preparó una disolución de trabajo conjunta por dilución en acetona a partir de las disoluciones madre, de tal forma que contuviese 10 mg/l de cada herbicida. Los patrones utilizados en las experiencias se prepararon por dilución a partir de la disolución de trabajo en acetona y acetona acidificada con 1% de ácido.

La disolución del patrón interno (Alacloro, herbicida utilizado para girasol y maíz, pero no para cereales) se preparó en acetona para conseguir una disolución madre de 1000 mg/l y se diluyó en acetona acidificada con 1% de ácido acético hasta una concentración de 1 mg/l, de la cual se añadía un volumen muy pequeño (20 µl) al vial antes del análisis con el objetivo de controlar la cantidad de analito que pasaba a la columna.

Se tuvo la precaución de usar viales topacio ya que algunos herbicidas se degradaban por acción de la luz [21].

2.2.3. MATERIAL DE LABORATORIO

- Matraces aforados de vidrio (clase A) de varios volúmenes.
- Balanza de resolución 0,0001 g de Methler (Barcelona).
- Evaporador y tubos de vidrio especiales de la marca Turbo vap, suministrados por Zymark (Hopkinton, MA).
- Pipetas Automáticas graduables de 0,1 ml a 1 ml y de 20 µl a 200 µl de Finpipette (Thermo Fischer, Barcelona)
- Jeringas de plástico de 2 ml suministrados por Scharlab (Barcelona).
- Filtros de jeringa de 0,45 µm suministrados por Scharlab.
- Viales de vidrio topacio de 2 ml, cápsulas y encapsulador suministrados por Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania).
- Estufa Heraeus (Madrid).
- Cámara de incubación Memmert (Schwabach, Alemania).

2.2.4. EQUIPOS

2.2.4.1. HPLC-DAD

El cromatógrafo de líquidos empleado fue el de la Series 1050 formado por una bomba cuaternaria, un muestreador automático y un detector de radiaciones ultravioletas emitidas por una lámpara de deuterio DAD del tipo Series 1100, todos de Hewlett Packard (Avondale, PA) (Figura 2.5). El equipo se controlaba con el software *HDChem* de Agilent Technologies que permitía la adquisición, almacenamiento y posterior tratamiento de los cromatogramas.



Figura 2.5. Equipo de HPLC-DAD empleado.

Con el objetivo de escoger las condiciones cromatográficas, se analizó una disolución de los herbicidas de 1 mg/l.

En las experiencias se utilizó la columna Novapak C18 de Waters (Manchester, UK), de dimensiones 150 x 3,9 mm y un tamaño de relleno de 5 μm , sin termostatar. Debido a la polaridad de los analitos, ésta fue la fase estacionaria más apropiada.

Se utilizó un volumen de inyección de 25 μl y un flujo constante de la fase móvil de 1 ml/min formado por una combinación binaria de agua y acetonitrilo. La selección de la fase móvil y su optimización se realizó experimentalmente para el ajuste de los tiempos de retención y de la calidad de los picos cromatográficos. Se modificaron las proporciones de acetonitrilo y agua para separar todos los herbicidas objeto de estudio. Como los picos obtenidos no eran lo suficientemente estrechos, se utilizaron diferentes proporciones de un modificador, ácido orto-fosfórico concentrado. Los disolventes que formaban la fase móvil se agitaban por ultrasonidos previamente a su uso para la eliminación de burbujas.

Para seleccionar las longitudes de onda de máxima absorción, se estudiaron los espectros individuales UV de absorción molecular que proporcionaba el DAD (Figura 2.11).

2.2.4.2. GC-AED

El cromatógrafo de gases empleado fue suministrado por Agilent Technologies, modelo 5890 Series II, equipado con un inyector automático modelo 7673 y un detector de emisión atómica modelo 5921A, ambos también de Agilent Technologies (Figura 2.6). El equipo era controlado por el software *ChemStation* suministrado igualmente por Agilent Technologies.

Con el objetivo de escoger las condiciones cromatográficas, se analizó una disolución de los herbicidas de 1 mg/l.



Figura 2.6. Equipo de GC-AED empleado.

La columna empleada fue la DB-17 (50% de fenil-metil silicona) de dimensiones 30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 μm de espesor de columna, suministrada por J & W Scientific (Agilent Technologies). Se utilizó helio como gas portador, con rampa de presiones y *make-up* de 80 cm/s. Se inyectaba en modo *splitless* durante 60 seg un volumen de 2 μl manteniendo la temperatura del inyector a 250°C.

La temperatura del detector fue de 250°C. Las líneas de emisión características de los átomos detectadas fueron: C₁₉₃, C₄₉₆, S₁₈₁, Cl₄₇₉ y N₁₇₄ nm.

2.2.4.3. GC-MS

Se utilizó el cromatógrafo 6890N de Agilent Technologies equipado con un inyector 7683 Series *Split/Splitless* y acoplado a un MS de cuadrupolo 5973, ambos también de Agilent Technologies (Figura 2.7). El sistema de adquisición de datos era el programa *Chemstation* de la misma casa comercial.



Figura 2.7. Equipo de GC-MS empleado.

El gas portador elegido fue helio a flujo constante de 1 ml/min. Se utilizó como fase estacionaria la misma que para el GC-AED. Se inyectó 1 μl de muestra en modo *pulsed splitless*, ya que reducía el volumen de expansión y, por tanto, el tiempo de residencia de los analitos en el sistema de inyección.

La energía de ionización del impacto electrónico era de 70 eV. La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C y la línea de transferencia a 280°C.

Con el objetivo de escoger las condiciones cromatográficas y de estudiar los espectros de masas, se inyectaron disoluciones individuales de los herbicidas de 1 mg/l en modo SCAN. En función de los resultados obtenidos, se dividieron los compuestos a analizar en los tres grupos a los que ya se ha hecho referencia en el punto 2.1.2 (Tabla 2.1).

Debido a que no se encontró una técnica de derivatización adecuada para los herbicidas de urea, se optimizaron los métodos de análisis e inyección para la formación cuantitativa de sus productos de degradación térmica. Se probaron condiciones especiales de temperatura y presión en el inyector, así como, la adición de 1% de ácido acético, para desplazar el equilibrio hacia la formación de los isocianatos, es decir, de los productos de degradación.

2.2.4.4. PTV-GC-TOF/MS

Parte de este trabajo se realizó durante una estancia en el Departamento de Plaguicidas y Contaminantes de RIKILT, Instituto de Seguridad Alimentaria, en Wageningen (Holanda), donde se tuvo la posibilidad de analizar todos los herbicidas aplicables a cebada, por las técnicas PTV-GC-TOF/MS y LC-(ESI)-MS/MS.

Las disoluciones patrón de herbicidas se prepararon en acetonitrilo.

El cromatógrafo de gases empleado fue suministrado por Agilent Technologies, modelo 6890N, equipado con un inyector PTV Optic 3 suministrado por ATAS GL Internacional (Veldhoven, The Netherlands) y un detector de tiempo de vuelo modelo Pegasus III de la marca LECO (St. Joseph, MI; USA), que operaba en modo SCAN (Figura 2.8). El equipo era controlado por los programas *ATAS Evolution Workstation*, *LECO ChromaTOF* y *Cycle Composer PALI*.



Figura 2.8. Equipo de PTV-GC-TOF/MS empleado.

La columna analítica usada como fase estacionaria era la RTX-CL para plaguicidas, de dimensiones 30 m × 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 μm de espesor de columna, de la marca Restek (Bellefonte, PA).

El gas portador era helio a flujo constante de 1,3 ml/min. Con el objetivo de escoger las condiciones cromatográficas y de estudiar los espectros de masas, se inyectó una disolución de los herbicidas de 1 mg/l.

El inyector PTV se usó en modo *solvent vent*, que permitía la introducción de grandes volúmenes de muestra. La muestra era inyectada a temperaturas por debajo del punto de ebullición del disolvente y la temperatura del *inlet* se mantenía baja mientras se eliminaba la mayoría de disolvente por la salida del *split*. Posteriormente, el *inlet* se calentaba rápidamente y los analitos se transferían a la cabeza de la columna. Se inyectaron 25 μl y 50 μl de acetonitrilo puro a 40°C con un flujo de *split* de 50 ml/min para conocer el tiempo que necesitaba la mayor parte del vapor de disolvente para salir del *inlet*, antes de aumentar la temperatura del inyector hasta 300°C a 5°C/min, para introducir los analitos en la columna. La presión del *inlet* utilizada era de 30 kPa.

Se usó un *liner* empaquetado de vidrio (*sintered glass liner*) de diámetro interno de 1,5 mm, para retener los analitos hasta su desorción a la columna. Se realizaron pruebas para conocer la retención de los analitos en este tipo de *liner*. Se inyectaron 2 μl de tres mezclas que contenían todos los patrones de diferentes concentraciones (50-150-250 $\mu\text{g/l}$) en modo *splitless* y se compararon con inyecciones de 25 μl y 50 μl en modo PTV. Las concentraciones en estos dos volúmenes se ajustaron para introducir la misma cantidad de analitos en la columna.

2.2.4.5. LC-(ESI)-MS/MS

Un detector de triple cuadrupolo modelo Quattromicro 02, suministrado por Micromass (Manchester, UK) se conectó a través de una interfase de electrospray (ESI), a un cromatógrafo de líquidos HPLC 1100 Series, suministrado por Agilent Technologies y equipado con una bomba cuaternaria (Figura 2.9). El equipo era controlado por el programa *MassLynx*.



Figura 2.9. Equipo de LC-(ESI)-MS/MS empleado.

Para la separación cromatográfica se utilizó una precolumna Xterra MS C₁₈ de 5 μm , (10 mm \times 2,1 mm), y una columna analítica Symmetry C₁₈ 5 μm , (150 mm \times 3 mm), ambas de la marca Waters.

Se optimizó el gradiente de la fase móvil formado por metanol y agua, conteniendo ambos ácido fórmico.

Para operar en MS/MS, se utilizaba Argón de 99,995% de pureza, como gas de colisión con una presión de $3,35 \times 10^{-3}$ mbar en la celda de colisión. Los voltajes de los capilares que se usaron fueron de 23 kV y 3 kV, en modo de ionización negativo y positivo,

respectivamente. La temperatura de la interfase fue de 350°C y la de la fuente de 120°C. Se escogieron tiempos de escaneo de 1 s/scan.

Los valores de los iones de los espectros de masas que se usaron para la detección de los compuestos fueron el resultado de la optimización llevada a cabo por infusiones de diluciones individuales de patrones de los herbicidas en metanol con una concentración de 10 mg/l. Se inyectaron en el equipo por medio de un sistema de inyección en flujo (FIA), conectado directamente al detector de MS/MS.

2.2.5. OPTIMIZACIÓN DE LA DERIVATIZACIÓN DEL GRUPO III

Todos los experimentos se llevaron a cabo únicamente con patrones diluidos en el disolvente adecuado a una concentración de 0,25 mg/l, para evitar introducir interferencias desde la matriz. Previamente se estudió la cantidad necesaria de TMSH encontrándose que 100 µl de una disolución de TMSH de 0,25 M en metanol añadidos a 500 µl de la disolución patrón, eran suficientes para asegurar la completa derivatización de los analitos en la mezcla.

Se usó una columna del mismo tipo, DB-17, pero diferente para los analitos derivatizados. El TMSH se descomponía térmicamente debido a las altas temperaturas del inyector, y, por tanto, no pasaba a la columna, pero aún así siempre era recomendable el uso de una columna diferente a la de los analitos sin derivatizar [72].

La optimización de la derivatización se llevó a cabo con un diseño ortogonal, en lugar de un diseño de parámetros de Taguchi, ya que no se usaron niveles de ruido. La introducción de niveles de ruido en una reacción de derivatización siempre es difícil porque depende en cada caso de las interferencias de la matriz presentes, que pueden derivatizarse y producir el mismo tipo de productos derivatizados que los analitos. Además, el TMSH producía cromatogramas limpios porque su exceso era totalmente descompuesto en el inyector [72], y se usaba el modo de análisis SIM, muy selectivo y poco afectado por las interferencias.

Tabla 2.2. Características de los analitos que necesitan derivatización para el análisis por GC.

Nº	Herbicida	Fórmula	Peso Mol.	pKa	Herbicida + TMSH	Fórmula	Peso Mol.
1	2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221,0	2,87	2,4-D metil	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235,0
2	Bromoxinil	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	276,9	3,86	Bromoxinil metil	C ₈ H ₅ Br ₂ NO	290,9
3	Bromoxinil oct.	C ₁₅ H ₁₇ Br ₂ NO ₂	403,0		Bromoxinil octanoato	C ₁₅ H ₁₇ Br ₂ NO ₂	403,0
4	Dicamba	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221,0	1,87	Dicamba metil	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235,0
5	Diclorprop p	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235,1	3,67	Diclorprop p metil	C ₁₀ H ₁₀ Cl ₂ O ₃	249,1
6	Diclofop	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	327,2	3,60			
7	Diclofop metil	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	341,2		Diclofop metil	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	341,2
8	Fenoxaprop p	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	333,7	4,60	Fenoxaprop p metil	C ₁₇ H ₁₄ ClNO ₅	347,7
9	Fenoxaprop p etil	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	361,8		Fenoxaprop p etil	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	361,8
10	Flamprop	C ₁₆ H ₁₃ ClFNO ₃	321,7	3,70	Flamprop metil	C ₁₇ H ₁₅ ClFNO ₃	335,7
11	Flamprop isop.	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363,8		Flamprop isopropil	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363,8
12	Ioxinil	C ₇ H ₃ I ₂ NO	370,9	4,10	Ioxinil metil	C ₈ H ₅ I ₂ NO	384,9
13	Ioxinil octanoato	C ₁₅ H ₁₇ I ₂ NO ₂	497,1		Ioxinil octanoato	C ₁₅ H ₁₇ I ₂ NO ₂	497,1
14	MCPA	C ₉ H ₉ ClO ₃	200,6	3,73	MCPA metil	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214,6
15	MCPA tioetil	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂ S	244,7		MCPA tioetil	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂ S	244,7
16	MCPP	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214,6	3,11	MCPP metil	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₃	228,6
17	MCPP isoocílico	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₃	326,5		MCPP isoocílico	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₃	326,5

Los herbicidas ácidos se dividieron en dos grupos, por una parte los que se usaban únicamente en su forma ácida, y por otra, los que se usaban también esterificados (Tabla

2.2). Estos ésteres se denominaron “originales” para diferenciarlos de los ésteres metílicos que se producían después de la esterificación (con la excepción del Diclofop metil, que tenía el mismo éster derivatizado y original), teniendo en cuenta que los ésteres originales se trans-esterificaban también a metílicos. Debido a esta doble formación de los ésteres metílicos, se desarrolló el mismo diseño ortogonal por separado para los herbicidas ácidos (denominado como “Matriz Ácida”) y para los ésteres originales (denominado como “Matriz Esterificada”), para saber a partir de que forma, ácida o esterificada, provenían los ésteres metílicos formados, y la manera en que las variables seleccionadas afectaban a las reacciones de esterificación y trans-esterificación.

La acetona, el acetonitrilo y el acetato de etilo, algunas veces a pH ácido, son los disolventes más utilizados para la extracción de un gran número de residuos de herbicidas que pertenecen a diferentes familias [85-87]. Los herbicidas ácidos se extraen en numerosas ocasiones a pH ácidos que suprimen su ionización haciéndoles más aptos para extraerse con disolventes orgánicos [60,63,69,85,88]. El estudio del efecto del pH en las reacciones de derivatización es muy importante porque afecta mucho al proceso [65]. Debido a esto, se seleccionaron como factores, la acetona, el acetonitrilo y el acetato de etilo, en condiciones mediana y fuertemente ácidas (con 1% de ácido acético y fosfórico, respectivamente) (Tabla 2.3).

La derivatización con el TMSH como reactivo derivatizante se ha realizado en algunos casos mediante inyección directa de los analitos y los reactivos derivatizantes en el sistema de inyección caliente, donde se produce directamente la derivatización por desprotonación y descomposición térmica de las sales resultantes de los ácidos [4,6]. Sin embargo, otros autores recomiendan una incubación previa a su inyección [73]. Para evaluar la utilidad de este calentamiento previo, las disoluciones patrón fueron incubadas durante 5-30-45 minutos a tres temperaturas diferentes: 20°C, mantenida en una cámara de incubación para simular la ausencia de precalentamiento, 40°C (temperatura máxima de calentamiento recomendada en la etiqueta del producto), y 70°C, ambas conseguidas en una estufa.

Tabla 2.3. Factores y Niveles experimentados, ajustados a un diseño ortogonal L₉(3⁴).

Notación	Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
<i>A</i>	Disolvente	Acetona (Ac)	Acetato de etilo (AcE)	Acetonitrilo (AcN)
<i>B</i>	Tiempo incubación (min)	5	30	45
<i>C</i>	T ^a incubación (°C)	20	40	70
<i>D</i>	pH	-	1% Ácido acético (HAc)	1% Ácido fosfórico (H ₃ PO ₃)

Tabla 2.4. Matriz del diseño ortogonal L₉(3⁴).

Prueba	Factores y Niveles			
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Por tanto, se seleccionaron las siguientes variables: temperatura y tiempo de incubación, disolvente y efecto del pH. Se escogieron tres niveles para cada factor, en vez de dos, para detectar cualquier relación no lineal entre los factores y las respuestas encontradas (Tabla 2.3).

Se ajustaron los cuatro factores a tres niveles, a un diseño ortogonal $L_9(3^4)$, que producía la máxima información con el menor número de experiencias. Las nueve experiencias diferentes que resultan del diseño se duplicaron para calcular el error residual y se llevaron a cabo aleatoriamente para no introducir errores sistemáticos. La Tabla 2.4 muestra los niveles de los factores escogidos para el experimento y la combinación de valores que se experimentaron.

2.2.6. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

El estudio de la existencia de efecto matriz es necesario realizarlo durante la validación del método [77]. La presencia o ausencia de los efectos matriz debe demostrarse mediante la comparación de la respuesta obtenida con el analito en disolvente y la respuesta proporcionada por la misma cantidad de analito en presencia de la matriz.

Se desarrolló el estudio, por tanto, con un suelo blanco (libre de herbicidas) y diferentes disolventes con el objeto de estudiar cual de ellos extraía más interferencias del suelo y, por tanto, producía un mayor efecto matriz. La extracción de 15 g de suelo se llevó a cabo durante 1 h de agitación orbital con 80 ml de los disolventes más usados en los métodos multiresiduo para determinar plaguicidas, es decir, acetona, acetonitrilo y acetato de etilo. Además se incluyó una mezcla de acetona-hexano (1:1), propuesta para un multiresiduo de herbicidas en suelo en el Método EPA 8085. Posteriormente se centrifugaba la muestra a 2500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se llevaba a sequedad reconstituyéndose con 1 ml de acetona acidificada con 1% de ácido acético.

Los niveles escogidos para ambos calibrados fueron: (0,05 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1 – 2 mg/l) y se obtuvieron por dilución a partir de una disolución mezcla de patrones de herbicidas en acetona. Los calibrados en matriz se prepararon añadiendo 600 μ l de extracto blanco de suelo preparado según el procedimiento detallado anteriormente en el diagrama de flujo (cantidad de matriz en cada vial: 5,63 g de suelo). Se añadió el mismo patrón interno a todos los niveles de ambos calibrados, de tal forma que su concentración final en los viales fue de 0,5 mg/l. Se añadió la cantidad adecuada de patrón de la disolución mezcla y se completó hasta un volumen final de 1 ml con acetona acidificada con 1% de ácido acético.

Antes de empezar, se comprobaba la linealidad de los calibrados y, posteriormente, se estudiaba estadísticamente el efecto matriz a través de tres tipos de pruebas:

1. Test t de igualdad de las pendientes.
2. Estudio del solapamiento de los intervalos de confianza de las pendientes.
3. Estudio del ajuste de ambos calibrados a una línea.

2.2.6.1. Test t de igualdad de las pendientes

La prueba t de Student es una prueba de significación de errores sistemáticos para la comprobación de hipótesis cuando el tamaño de la muestra es pequeño. Compara dos rectas de regresión para estudiar si no presentan diferencias significativas, es decir, determina si es probable que las dos muestras procedan de distribuciones con medias de población iguales. Para ello se proponen dos hipótesis:

H_0 = Hipótesis nula: no hay diferencias significativas entre las pendientes: $b_1 = b_2$

H_1 = Hipótesis alternativa: hay diferencias significativas entre las pendientes: $b_1 \neq b_2$, que se adoptará en el supuesto de que se rechace la hipótesis nula.

Éstas se comprueban por comparación de un valor de t *tabulado* con un valor de t *calculado*. La falta de diferencias significativas entre ambas pendientes indica que no existe un efecto matriz detectable [89].

Los valores de t se determinan de manera diferente si los dos conjuntos de datos proceden de distribuciones con iguales o diferentes varianzas:

Test de F de Snedecor: La prueba de F es una prueba de significación paramétrica de errores aleatorios que compara precisiones. Se comprueba la igualdad o diferencia de las varianzas a través de la comparación de un valor de F *calculado* con un valor de F *tabulado*. Un valor de F *calculado* cercano a 1 proporciona pruebas de que las varianzas de población subyacentes no son estadísticamente diferentes.

- 1 F *calculado*: es el cociente de las varianzas de las pendientes para los dos calibrados (considerando como varianza la desviación de la pendiente para cada calibrado). Siempre tiene que tener un valor mayor que uno por lo que la varianza mayor se coloca en el numerador.

$$F = Sb_1^2 / Sb_2^2 \quad \text{si} \quad Sb_1 > Sb_2$$

- 2 F *tabulado*: se busca en tablas o se calcula con la función de Microsoft Excel: DISTR.F.INV(0,05;gl₁;gl₂). 0,05 representa la probabilidad del 95% para una distribución F de dos colas y $gl_1 = (n_1 - 2)$ son los grados de libertad del calibrado colocado en el numerador (con la mayor desviación de la pendiente) y $gl_2 = (n_2 - 2)$ los grados de libertad del calibrado con menor varianza.

- Si $F_{cal} < F_{tab}$: hay que realizar el Test de t para dos muestras suponiendo que los dos conjuntos de datos proceden de distribuciones con las mismas varianzas. Se conoce con el nombre de **prueba t homocedástica**. Cálculo de los valores de t:

t *calculado*:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{\sum (x_{i1} - \bar{x})^2} + \frac{1}{\sum (x_{i2} - \bar{x})^2} \right)}} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s^2 \left(\frac{Sb_1}{S_{y/x1}} \right)^2 + s^2 \left(\frac{Sb_2}{S_{y/x2}} \right)^2}}$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 2)S_{y/x1}^2 + (n_2 - 2)S_{y/x2}^2}{(n_1 + n_2 - 4)}$$

donde b es la pendiente, Sb es la desviación de la pendiente, y $S_{y/x}$ es la desviación del ajuste.

t *tabulado* (también llamado *crítico*): se busca en tablas o se calcula con la función de Microsoft Excel: DISTR.T.INV(0,05;gl₁+gl₂); $gl_1+gl_2 = (n_1+n_2-4)$. Devuelve el valor de la t de Student tabulado para una probabilidad dada. En este caso: 0,05 que representa la probabilidad del 95%, y gl_1 y gl_2 son los grados de libertad de ambos calibrados.

- Si $F_{cal} > F_{tab}$: hay que realizar el Test de t para dos muestras suponiendo que los dos conjuntos de datos proceden de distribuciones con varianzas desiguales. Se conoce con el nombre de **prueba t heterocedástica**. Cálculo de los valores de t:

t calculado:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{\left(\frac{S_{y/x1}^2}{\sum (x_{i1} - \bar{x})^2} + \frac{S_{y/x2}^2}{\sum (x_{i2} - \bar{x})^2} \right)}}$$

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{Sb_1^2 + Sb_2^2}}$$

t crítico: en este caso no está tabulado, hay que calcularlo

$$t_{crit} = \frac{t_1 S_{b1}^2 + t_2 S_{b2}^2}{Sb_1^2 + Sb_2^2}$$

donde t_1 y t_2 están tabulados y se buscan en tablas o se calculan como: $t_1 = \text{DISTR.T.INV}(0,05;g_{l1})$; $g_{l1} = n_1 - 2$; y $t_2 = \text{DISTR.T.INV}(0,05;g_{l2})$; $g_{l2} = n_2 - 2$.

Test t de igualdad de las pendientes:

1. Si $t_{cal} < t_{tab}$. o crítica: se acepta la hipótesis nula: las pendientes no presentan diferencias significativas. No hay efecto matriz.
2. Si $t_{cal} > t_{tab}$. o crítica: se rechaza la hipótesis nula: las pendientes tienen diferencias significativas. Hay efecto matriz.

2.2.6.2. Solapamiento de los intervalos de confianza de las pendientes

En principio se puede decir que dos líneas de regresión son comparables cuando sus pendientes son paralelas, pero será suficiente si los intervalos de confianza de ambas pendientes se solapan [90].

Cálculo de límites de confianza de la pendiente: $b \pm tSb$

donde $t = \text{DISTR.T.INV}(0,05;g_l)$; $g_l = n - 2$

Sb es la desviación de la pendiente:

$$Sb = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

y $S_{y/x}$ es la desviación del ajuste:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{(n - 2)}}$$

$$S_{y/x} = \text{ERROR.TIPICO}(\text{conocido } y; \text{conocido } x)$$

2.2.6.3. Ajuste de ambos calibrados a una línea

Para demostrar que los calibrados son estadísticamente comparables y, por tanto, no existe efecto matriz, los valores de las respuestas para ambos calibrados deben ajustarse a una línea, es decir, si ambos calibrados son comparables, la recta construida a partir de ellos debe ser la bisectriz. Se coloca como variable en el eje "X" las respuestas del calibrado más preciso (el de menor desviación de la pendiente, que también tendrá la menor desviación del ajuste), y como variable en el eje "Y" las respuestas del calibrado menos preciso (el de mayor desviación de la pendiente y del ajuste). Es decir:

1. La Ordenada en el Origen debe ser igual a cero, o estadísticamente igual a cero, es decir, los intervalos de confianza de la ordenada en el origen deben incluir al cero. Si no lo incluyen es que se está introduciendo un sesgo.

Intervalo de confianza de la ordenada en el origen = $a \pm tSa$

donde $t = \text{DISTR.T.INV}(0,05;gl)$; $gl = n-2$

y la desviación de la ordenada en el origen:

$$Sa = Sb \sqrt{\frac{\sum xi^2}{n}}$$

2. La Pendiente debe ser igual a uno; o estadísticamente igual a uno, es decir, los intervalos de confianza de la pendiente deben incluir al uno.

Intervalo de confianza de la pendiente = $b \pm tSb$

donde $t = \text{DISTR.T.INV}(0,05;gl)$; $gl = n-2$

y la desviación de la pendiente:

$$Sb = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2}}$$

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan a continuación los resultados encontrados cuando se analizan los herbicidas de estudio por las diferentes técnicas cromatográficas estudiadas. Se han validado para poder compararlas entre sí y demostrar que el método analítico desarrollado es lo suficientemente sensible y reproducible para analizar los herbicidas de estudio en las muestras generadas a lo largo de este trabajo.

2.3.1. HPLC-DAD

2.3.1.1. Optimización de la Fase Móvil

La polaridad, el tamaño, la masa y la capacidad de ionizarse de los analitos son algunos de los parámetros que van a intervenir en la afinidad de la molécula por la fase estacionaria (Tabla 2.1). En HPLC numerosos factores pueden intervenir sobre la eficacia de la separación de los compuestos y, principalmente, sobre la velocidad de migración en la columna, siendo los más importantes la composición y gradiente de la fase móvil aunque también puede usarse la temperatura.

Se intentaron separar, sin éxito, todos los herbicidas estudiados (Grupos I, II y III) probando distintas fases móviles formadas por acetonitrilo:agua en diferentes proporciones y con diferentes cantidades de ácido fosfórico (Figura 2.10).

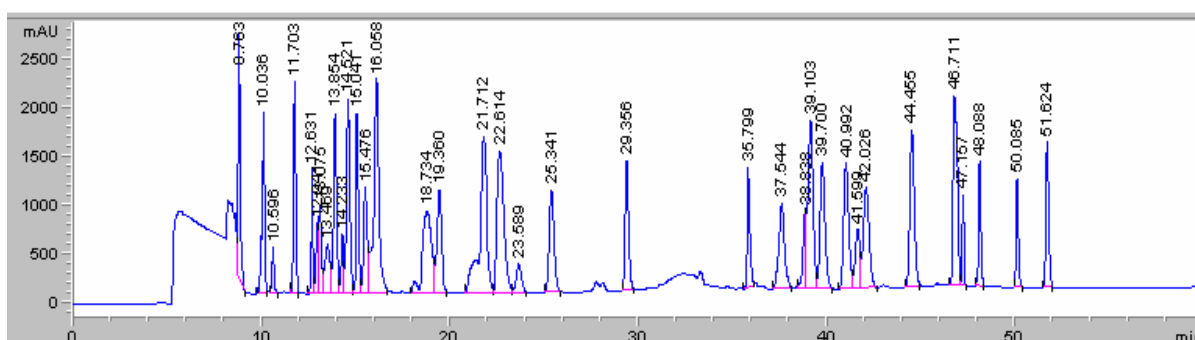


Figura 2.10. Cromatograma de los herbicidas analizados por HPLC-DAD. Fue imposible separar los que salían al principio del cromatograma, con las distintas fases móviles ensayadas.

2.3.1.2. Detección

Debido al poco éxito en la separación de los analitos cambiando el gradiente de la fase móvil, se estudiaron los espectros individuales de absorción en UV para intentar identificar los herbicidas que co-eluían mediante sus diferentes longitudes de onda de máxima absorción.

El problema era que, como se observa en la Figura 2.11, sus espectros de absorción eran muy similares y sus máximos de absorción se producían a longitudes de onda parecidas, no permitiendo la diferenciación. Debido a esto, el uso de DAD no proporcionaba la selectividad suficiente para poder separar los analitos solapados (Figura 2.10), y, por tanto, no se utilizó esta técnica para analizar los herbicidas objeto de estudio.



Figura 2.11. Espectros de absorción UV de algunos de los herbicidas que se solapan por HPLC-DAD.

2.3.2. GC-AED

Únicamente se han analizado por GC-AED, los herbicidas que pertenecen a los Grupos I y II. En el caso de estos últimos, van a usarse sus productos de degradación térmica.

2.3.2.1. Optimización del programa de Temperaturas

El modo *splitless* hace que la purga al principio esté cerrada lo que permite la transferencia de la totalidad de los compuestos en la cabeza de la columna, abriéndose después para purgar los vapores restantes de la inyección. Se utilizó este modo de inyección ya que se analizaban compuestos a nivel de trazas.

En GC, la separación de los analitos se produce por efecto de la temperatura, que influye en el estado de equilibrio del compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil. La temperatura inicial del horno, en principio, debe ser 20°C inferior al punto de ebullición del disolvente en el cual están disueltas las muestras y se debe mantener esta temperatura durante todo el tiempo que permanece la purga cerrada. Se hicieron pruebas pinchando vapor de acetona a 40°C (su punto de ebullición es de 58°C) y a 60°C. Como el pico de la acetona salía al mismo tiempo en ambos casos, se fijó la temperatura inicial del cromatograma en 60°C ya que una mayor temperatura inicial facilitaba que los picos eluyeran antes y se resolvieran mejor. El programa de temperaturas optimizado era el siguiente: se mantenía la temperatura inicial (60°C) durante 1 min y después se subía a 170°C a 5°C/min. Posteriormente se aumentaba hasta 185°C a 0,7°C/min, para, por último, subir hasta 270°C a 3°C/min, donde se mantenía la temperatura 7,24 min.

2.3.2.2. Detección

El AED tiene su principal ventaja en su capacidad para determinar simultáneamente las emisiones atómicas de muchos elementos de los analitos que eluyen de la columna capilar de GC. Se escogió la línea de emisión del átomo de C₁₉₃ para cuantificar, ya que producía una señal muy intensa al ser un elemento muy abundante en compuestos orgánicos como los herbicidas, dejando las demás, sobre todo las líneas de los átomos de Cl₄₇₉ y de S₁₈₁, para la confirmación de los residuos al ser muy selectivas, pudiendo usarse también para cuantificar analitos co-eluidos en la línea de C₁₉₃. La línea del N₁₇₄ no se utilizó ya que tenía peor resolución debido al ruido en la línea de base.

A pesar de haber optimizado la rampa de temperaturas y presiones para lograr separar todos los analitos estudiados, aparecieron dificultades para separar algunos compuestos ya que eluían juntos, lo que se apreciaba en la línea del C₁₉₃. La ventaja de usar este detector era que permitía identificar los picos co-eluidos por medio de la emisión de sus átomos característicos, lo que se apreciaba en los 3 picos solapados en el minuto 34 (Figura 2.12). Dos de ellos tenían átomos específicos de azufre (Metribuzina y Terbutrina), y uno de cloro (Linuron), permitiendo su separación en las líneas de estos átomos en particular.

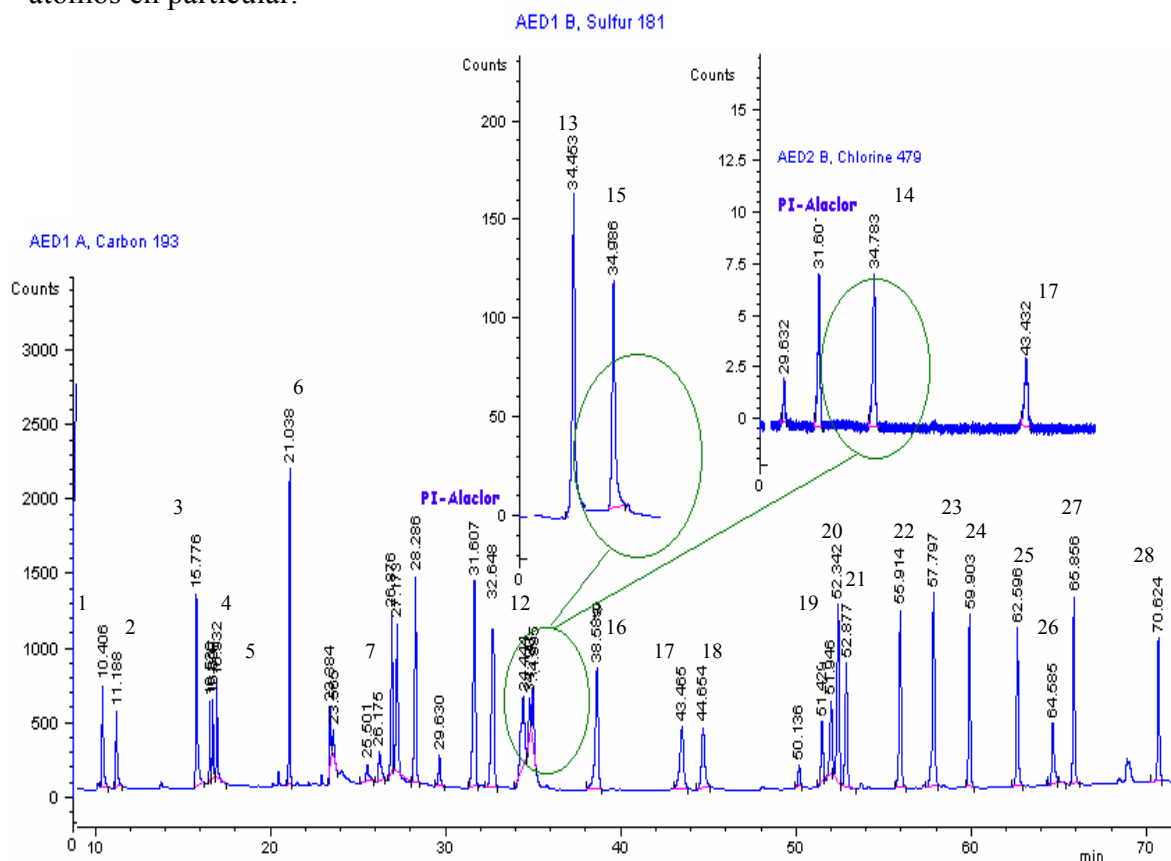


Figura 2.12. Ejemplo de identificación de picos co-eluidos gracias a sus líneas de emisión características. Los picos se han numerado como en la Tabla 2.5.

2.3.3.3. Validación

Se han determinado varios parámetros de validación con el promedio de 5 calibrados independientes en el rango (0,25 - 5 mg/l) a siete niveles, a partir de las respuestas que producen los herbicidas en la línea del C₁₉₃. Los parámetros son la linealidad, el coeficiente de variación de los factores de respuesta, el LD, y el coeficiente de variación de los tiempos de retención (Tabla 2.5).

Linealidad

El ajuste se realizó mediante el método de mínimos cuadrados sin forzar las rectas por el origen. Se recomienda no utilizar el Coeficiente de Determinación para demostrar la linealidad de los calibrados. Estos coeficientes sólo dan información de lo buena que es la correlación entre las variables al proporcionar el porcentaje de información que explica el modelo de ajuste, pero no sirven para estimar la validez del modelo. Se representó gráficamente el ajuste de la función de calibración y se inspeccionó visualmente además de calcular los coeficientes de linealidad y los coeficientes de

variación de los factores de respuesta, para comprobar la linealidad. El coeficiente de linealidad es más adecuado que el coeficiente de determinación, y se calculó como un porcentaje con la pendiente (b) y su desviación (S_b):

$$r = (1 - S_b/b) 100$$

Tabla 2.5. Parámetros de Validación de los herbicidas de los Grupos I y II por GC-AED. %CVfr Coeficiente de Variación del Factor de Respuesta. Se han subrayado los valores que no cumplen los criterios.

Nº	Analito	Elementos característicos	Tiempo Ret. (min)	%CV Tiempo Ret.	Coef. Lin.	%CVfr	LD Instrum. (mg/l)
1	Isoproturon	N	10,41	0,042	<u>94,6</u>	13,4	0,72
2	Clortoluron	N-Cl	11,19	0,043	95,0	12,3	0,67
3	Tribenuron metil	N-S	15,78	0,015	96,4	12,5	0,48
4	Amidosulfuron	N-S	16,33	0,033	<u>83,3</u>	<u>20,6</u>	1,12
5	Metoxuron	N-Cl	17,23	0,014	95,6	12,5	0,59
6	Trifluralina	N	21,04	0,011	96,5	7,6	0,46
7	Metabenzotiazuron	N-S	26,18	0,012	<u>86,0</u>	<u>17,8</u>	1,88
8	Trialato	N-Cl-S	26,98	0,011	96,6	7,6	0,45
9	Terbutilazina	N-Cl	27,17	0,021	96,8	7,5	0,42
10	MCPA tioetil	Cl-S	28,29	0,015	96,9	7,1	0,41
11	Alacloro (PI)	N-Cl	31,61	0,017			
12	Prosulfocarb	N-S	32,65	0,015	96,7	7,7	0,44
13	Metribuzina	N-S	34,45	0,022	97,0	8,2	0,40
14	Linuron	N-Cl	34,78	0,024	96,5	11,2	0,47
15	Terbutrina	N-S	34,99	0,024	96,2	8,4	0,50
16	Pendimetalina	N	38,58	0,020	96,8	7,6	0,42
17	Cianazina	N-Cl	43,46	0,029	97,0	7,6	0,40
18	MCPP isooctílico	Cl	44,65	0,017	96,9	9,2	0,42
19	Flamprop isopropil	N-Cl	51,95	0,009	96,6	10,2	0,45
20	Bromoxinil octanoato	N	52,34	0,011	96,8	7,6	0,43
21	Carfentrazona etil	N-Cl	52,88	0,025	95,6	10,4	0,51
22	Diflufenican	N	55,91	0,006	96,6	8,6	0,46
23	Diclofop metil	Cl	57,80	0,005	96,8	7,1	0,43
24	Mefenpir dietil	N-Cl	59,90	0,009	96,5	7,7	0,46
25	Bifenox	N-Cl	62,60	0,004	96,7	8,0	0,44
26	Ioxinil octanoato	N	64,59	0,005	96,4	9,5	0,48
27	Tralkoxidim	N	65,86	0,000	<u>88,6</u>	<u>30,4</u>	1,34
28	Fenoxaprop p etil	N-Cl	70,62	0,006	96,4	9,6	0,49
Criterios				< 0,5%	> 95%	< 15%	

Límite de detección instrumental

El LD es la concentración o cantidad derivada de la respuesta más pequeña que puede ser detectada con una certeza razonable mediante un procedimiento analítico dado. El LD se calculó según las recomendaciones de la IUPAC [91], es decir, a partir de la pendiente y la desviación del ajuste ($S_{y/x}$):

$$LD = k S_{y/x} / b, \text{ donde } k = 3,29 \text{ [92].}$$

Se obtuvieron calibrados lineales para todos los compuestos analizados por GC-AED en todo el rango. Se demostró la linealidad en las respuestas de los calibrados de los productos de degradación de las ureas, por lo que la cuantificación con estos productos

de degradación era cuantitativa y su uso adecuado, análogamente a los resultados encontrados en la bibliografía [93-95].

2.3.3. GC-MS

El MS utilizado tenía un analizador de masas de cuadrupolo e ionización por impacto electrónico, modo de ionización que produce numerosos fragmentos que proporcionan mucha información estructural y, a la vez, disminuyen el ruido de fondo frente a otras técnicas de ionización, lo cual permite bajar más los LD.

2.3.3.1. Optimización de la Inyección

Se escoge la inyección con pulso de presión (*pulsed splitless*) porque disminuye el efecto matriz en el análisis de muestras reales [96]. La técnica consistió en incrementar la presión en la cabeza de la columna (30 psi) por poco tiempo (1,5 min) durante la inyección de la muestra. Esto producía más flujo de gas portador a través del inyector y un transporte más rápido de los vapores de las muestras a la columna de GC. Así el tiempo de residencia de los analitos en la cámara de inyección era mucho menor que en la inyección en *splitless*. Como resultado se producía una disminución significativa de la adsorción y/o degradación de los analitos en el *inlet* del inyector.

En el caso de los herbicidas del Grupo II, se usaron sus productos de degradación térmica para su análisis por GC-MS, al igual que en el análisis por GC-AED. La reacción de degradación térmica que se producía era una reacción de equilibrio de conversión de ureas en isocianatos. Se estudiaron condiciones especiales de temperatura (300°C) y presión de inyección para desplazar el equilibrio hacia la formación de los productos de degradación, según las recomendaciones encontradas en la bibliografía [37,56], pero al no apreciar un efecto beneficioso respecto de las condiciones generales de inyección para los herbicidas del Grupo I, se inyectaron de la misma manera descrita anteriormente los 3 grupos de herbicidas.

2.3.3.2. Optimización del programa de Temperaturas

Grupos I y II

Se optimizó el programa de temperaturas para que los analitos eluyeran lo más rápidamente posible. Se escogió la misma temperatura inicial del horno que en el caso de GC-AED.

La temperatura del horno para los analitos del Grupo I y II se mantuvo a 60°C durante 1 min y después se programó a 6°C/min hasta 165°C, posteriormente a 12°C/min hasta 215°C, después a 2°C/min hasta 230°C y, por último, a 8°C/min hasta 280°C, donde se mantuvo 10 min. Por último, se calentaba la columna 10 min a 300°C para que limpiara los posibles residuos.

Grupo III: con Derivatización previa

Estos herbicidas se analizaron por separado ya que necesitaban una etapa de derivatización previa a su análisis por GC, lo que hizo que la optimización de su análisis fuera más laboriosa que para el resto de herbicidas.

El programa de temperaturas optimizado fue el siguiente: se mantuvo la temperatura inicial de 60°C durante 1 min y luego se programó a 22°C/min hasta 290°C, manteniéndola 4,55 min.

2.3.3.3. Detección

Después de la adquisición de un cromatograma en SCAN de la mezcla de patrones en acetona, los picos se identificaron en función de su espectro de masas. Se usaron las librerías incluidas en el software del equipo, en este caso la *NIST (National Institute of Standards and Technology, EEUU)*.

Los análisis se llevaron a cabo en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), seleccionando las distintas ventanas de tiempo para cada herbicida o grupos de herbicidas analizados. Este modo aportaba una sensibilidad mayor que el SCAN, disminuyendo mucho el ruido de fondo, lo que permitió mejorar los LD, un aspecto muy importante para el estudio de residuos.

Se escogieron iones característicos de cada herbicida que no coincidían con los iones de los compuestos adyacentes, por lo que el solapamiento de los picos no impedía la correcta identificación y cuantificación de los compuestos.

Aunque ya se conocía que para los herbicidas del Grupo II se cuantificaban sus productos de degradación térmica, el estudio de sus espectros de masas proporcionó mayor información sobre las rupturas térmicas producidas en el inyector.

Fenilureas

En su caso se generaban productos de degradación específicos que eran reproducibles y cuantitativos, como los isocianatos, por lo que se usaban para su análisis por GC (Figura 2.13).

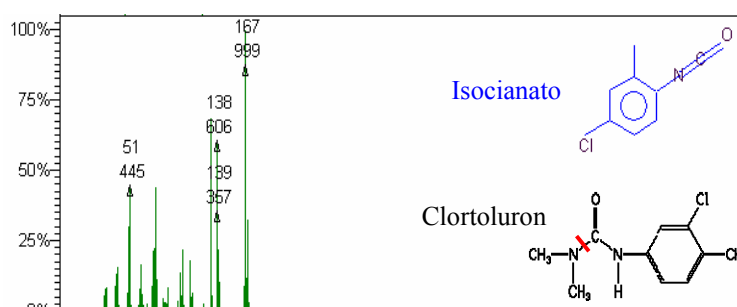
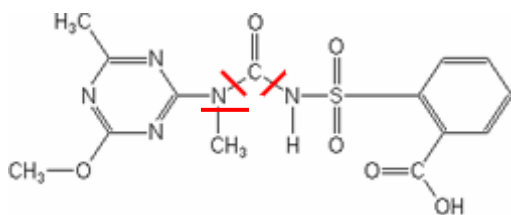


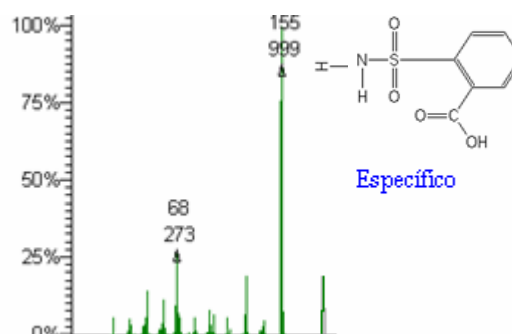
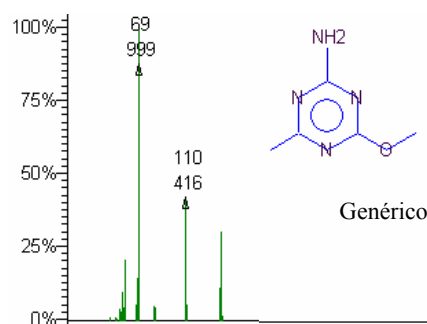
Figura 2.13. Ejemplo de isocianato formado por degradación térmica a partir del Clortoluron .

Sulfonilureas

Producían dos productos de degradación: uno común y otro específico (Figura 2.14), que fue el seleccionado para el análisis. Se sabe que sus productos de degradación cambian según el disolvente utilizado, pero esto no les afectó a las sulfonilureas seleccionadas con los disolventes orgánicos usados a lo largo del desarrollo de este trabajo.



Figuras 2.14. Producto genérico de degradación común a las Sulfonilureas, y Producto de degradación específico del Tribenuron metil.



Los tiempos de retención de los compuestos de los Grupos I y II y sus iones específicos se presentan en la Tabla 2.6 y un cromatograma conjunto en la Figura 2.18. En algunos casos, se escogieron iones de masas menores a 100, ya que no existían otros iones mayores, como es el caso de los Hidroxibenzonitrilos sustituidos, Bromoxinil octanoato e Ioxinil octanoato, cuyas masas moleculares son elevadas, pero cuyos espectros de masas no contienen iones significativos a $m/z > 127$ [62].

Tabla 2.6. Características del Análisis de los Herbicidas del Grupo I y II por GC-MS.

Grupo	Nº	Analito	Tiempo retención (min)	Ión Cuantificador	Iones Cualificadores	
I	1	Cianazina	15,87	240	225	173
	2	Terbutilazina	13,46	173	214	229
	3	Terbutrina	14,72	226	185	241
	4	Metribuzina	14,84	198	214	144
	5	Carfentrazona etil	18,50	312	340	303
	6	Prosulfocarb	14,42	251	128	91
	7	Triallato	13,42	270	268	128
	8	Pendimetalina	15,35	252	281	162
	9	Trifluralina	11,50	306	264	290
	10	MCPA tioetil	13,77	244	155	125
	11	Flamprop isopropil	17,68	105	276	363
	12	Fenoxaprop p etil	23,12	288	361	261
	13	Diclofop metil	19,60	340	342	281
	14	MCPP isooctílico	15,32	169	326	142
	15	Bromoxinil octanoato	18,40	127	57	247
	16	Ioxinil octanoato	22,12	127	57	242
	17	Diflufenican	18,98	394	266	246
	18	Bifenox	21,55	341	311	279
	19	Mefenpir dietil	20,05	299	227	186
	20	Tralkoxidim	22,93	137	283	268
	21	Metabenzotiazuron	13,45	164	136	135
II	22	Amidosulfuron	9,75	154	155	126
	23	Tribenuron metil	10,14	154	153	124
	24	Metoxuron	10,26	168	183	140
	25	Isoproturon	7,67	161	146	128
	26	Clortoluron	8,08	167	132	169
	27	Linuron	15,00	248	187	161
PI	Alacloro	14,22	160	188	237	

Grupo III: Búsqueda de los espectros de los ésteres metílicos

Después de la adquisición de una mezcla patrón en acetona en modo SCAN derivatizada, los picos se identificaron por sus espectros de masas. La metilación de los ácidos carboxílicos con TMSH producía los correspondientes ésteres metílicos, mientras que aplicado a los fenoles (Bromoxinil e Ioxinil), el producto resultante eran sus éteres metílicos.

Algunos espectros de los ésteres/éteres metílicos de los herbicidas derivatizados no pudieron encontrarse en la librería *NIST*. En general, estos espectros mostraban los mismos iones de ruptura que el herbicida ácido del que provenían, con la particularidad de que el ión molecular era 14 una más pesado, resultado de la adición de $-CH_3$ al grupo ácido/fenol para conseguir el correspondiente éster/éter metílico. Se compraron patrones de los ésteres metílicos para asegurar que los productos de la derivatización

con TMSH, producían el compuesto esperado mediante la comparación del espectro y del tiempo de retención.

Se escogió como ión cuantificador el más abundante y pesado que no mostraba interferencias cromatográficas, que en algunos casos coincidía para los ésteres originales y los metílicos (Tabla 2.7). Los ésteres metílicos presentaban tiempos de retención menores que los ésteres originales, ya que estos últimos eran más pesados.

Tabla 2.7. Tiempos de retención e iones para los herbicidas ácidos y sus ésteres originales. Los herbicidas ácidos se analizaron en forma de sus ésteres metílicos.

Grupo	Nº	Herbicida + TMSH	Tiempo retención (min)	Ión Cuantificador	Iones Cualificadores	
III	1	2,4-D metil	8,91	199	234	175
	2	Bromoxinil metil	9,05	291	276	248
	3	Bromoxinil octanoato	11,96	127	57	247
	4	Dicamba metil	8,21	203	205	234
	5	Diclorprop p metil	8,60	162	189	248
	6	Diclofop metil	12,58	340	342	281
	7	Fenoxaprop p metil	14,31	347	288	261
	8	Fenoxaprop p etil	14,57	288	361	261
	9	Flamprop metil	11,65	105	276	335
	10	Flamprop isopropil	11,72	105	276	363
	11	Ioxinil metil	10,73	385	370	243
	12	Ioxinil octanoato	14,03	127	57	242
	13	MCPA metil	8,43	214	141	155
	14	MCPA tioetil	9,84	244	155	125
	15	MCPA metil	8,16	169	142	228
	16	MCPA isooctílico	10,81	169	326	142
PI	Alacloro		10,15	160	188	237

2.3.3.4. Optimización de la Derivatización del Grupo III

Evaluación de la reacción de derivatización

Se observó que el TMSH producía dos reacciones:

- **Esterificación:** el primer paso en la reacción de derivatización es la formación de las sales de trimetilsulfonio por desprotonación de los analitos ácidos con el TMSH básico a temperatura ambiente. Mediante calentamiento, estas sales se descomponen térmicamente para producir los derivatizados metilados y sulfuro de dimetilo (Figura 2.15-1).
- **Trans-esterificación:** los ésteres pueden convertirse en sus correspondientes ésteres metílicos mediante una sencilla trans-esterificación. Consiste en el desplazamiento de la porción alcohólica de un éster por otro alcohol. La reacción con TMSH demostró no ser realmente una trans-esterificación, porque inicialmente se producía una saponificación en el medio básico proporcionado por el TMSH [85], es decir, la hidrólisis del éster en condiciones básicas para formar el alcohol a partir de la sal del ácido. Esta sal se descomponía a continuación en su éster metílico por acción del calor (Figura 2.15-2).

La trans-esterificación de los ésteres conjugados a ésteres/éteres metílicos es un equilibrio y la formación del éster/éter más pequeño está favorecida, así como en condiciones ácidas. Se observó que las trans-esterificaciones del Flamprop isopropil,

y el Fenoxaprop p etil no ocurrían u ocurrían en pequeña medida, lo que se cree debido a que su tamaño era muy parecido a sus ésteres metílicos y el equilibrio no estaba lo suficientemente desplazado.

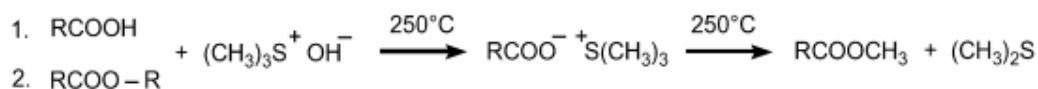


Figura 2.15. 1) Metilación de los ácidos mediante la pirólisis de la sal formada por la reacción con TMSH; 2) Saponificación de los ésteres en medio básico para producir el anión y la subsecuente metilación.

Resultados del Diseño ortogonal

Como variable a optimizar se consideró el valor del área total de los picos. No se realizó ninguna calibración ya que el objetivo era conseguir la mayor formación de ésteres/éteres metílicos posible. Se escogieron más variables a optimizar, debido a la doble formación de ésteres metílicos y a los dos diseños ortogonales diferentes para los herbicidas en sus formas ácidas (Matriz Ácida) u originalmente esterificadas (Matriz Esterificada). El valor del área total de los picos de los ésteres metílicos (*APEM*) se calculó para ambas matrices y, el área total de los picos de los ésteres originales (*APEO*) sólo se evaluó en la matriz esterificada para conocer la cantidad de ésteres originales que permanecía tras la derivatización. La Tabla 2.8 muestra el diseño experimental de las matrices y los resultados de *APEM* y *APEO* obtenidos por duplicado para cada uno de los 9 experimentos resultantes en ambas matrices.

Tabla 2.8. Diseño ortogonal $L_9(3^4)$ experimental con los factores y niveles experimentados. *APEM* se calculó para ambas matrices (Ácida y Esterificada), mientras que *APEO* sólo se determinó para la matriz de los Ésteres.

Prueba	Factores y Niveles				<i>APEM</i> ($\times 10^{-5}$)		<i>APEO</i> ($\times 10^{-5}$)
	<i>A</i> (Dislv)	<i>B</i> (seg)	<i>C</i> ($^\circ\text{C}$)	<i>D</i> (%Ácido)	Ácidos	Ésteres	Ésteres
1	Ac	5	20		69,3	95,6	63,7
					76,0	140,1	67,5
2	Ac	30	40	1%HAc	106,8	37,1	419,7
					115,5	32,6	412,6
3	Ac	45	70	1%H ₃ PO ₃	13,8	9,0	503,4
					12,4	7,4	450,2
4	AcE	5	40	1%H ₃ PO ₃	11,4	9,3	480,8
					12,3	7,4	448,1
5	AcE	30	70		89,3	101,0	79,4
					83,3	92,2	70,9
6	AcE	45	20	1%HAc	91,2	52,2	491,1
					117,6	45,6	494,3
7	AcN	5	70	1%HAc	108,9	42,7	543,5
					105,4	48,9	480,9
8	AcN	30	20	1%H ₃ PO ₃	14,3	5,9	510,8
					13,0	6,0	543,6
9	AcN	45	40		110,6	208,1	66,5
					104,8	207,0	68,7

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estos datos experimentales con el objetivo de identificar las fuentes individuales de variación y calcular la contribución de

cada factor a la variación de las respuestas (Tabla 2.9). Se eliminó el Diclofop metil de los cálculos en la matriz esterificada, ya que su éster original era también el metílico, y no era posible conocer su evolución con los parámetros estudiados. El Fenoxaprop p metil también se eliminó de los cálculos ya que era inestable en medio básico, lo que podía conducir a resultados erróneos.

Tabla 2.9. ANOVA para el análisis de *APEM* en la matriz de Ácidos y Ésteres, y de *APEO* en la matriz de los Ésteres.

Fuente de Variación	A. Disolv.	B. Tiempo Incub.	C. T ^a Incub.	D. pH	Residuales	Total
Grados de Libertad	2	2	2	2		8
<i>APEM</i> Suma de cuadrados (x 10 ⁴)	3,81	3,77	5,41	301,80		319,30
(Matriz <i>Pool</i> Ácida) Ratio de la Varianza (F) ^a				129,20		
<i>Pooled</i> suma de cuadrados	Si	Si	Si	No	Si	
Contribución (%) ^b				294,40	19,90	319,30
				93,78	6,22	100,00
<i>APEM</i> Suma de cuadrados (x 10 ⁴)	47,94	56,20	36,40	566,51		718,05
(Matriz <i>Pool</i> Ésteres) Ratio de la Varianza (F) ^a	19,61	22,99	14,89	231,75		
<i>Pooled</i> suma de cuadrados	No	No	No	No	Si	
Contribución (%) ^b	45,50	53,75	33,95	564,07	20,78	718,05
	6,34	7,49	4,73	78,56	2,89	100,00
<i>APEO</i> Suma de cuadrados (x 10 ⁴)	69,00	1,58	70,98	6778,50		6960,01
(Matriz <i>Pool</i> Ésteres) Ratio de la Varianza (F) ^a				280,03		
<i>Pooled</i> suma de cuadrados	Si	Si	Si	No	Si	
Contribución (%) ^b				6754,25	205,75	
				97,04	2,96	100,00

^a La Varianza crítica para un 95% de intervalo de confianza es 19,0.

^b La contribución se define como 100 x (*pooled* suma de cuadrados/ suma de cuadrados total).

Las ANOVAs para ambas matrices revelaban que el factor D (pH) era el que más contribuía a la variabilidad de la señal (93,78% para la formación de los ésteres metílicos, 78,56% para la conversión de los ésteres metílicos y 97,04% para la permanencia de los ésteres originales). Únicamente se tuvieron en cuenta las contribuciones de las otras variables en la matriz de los ésteres para la trans-esterificación, aunque eran muy pequeñas (6,34% para el disolvente, 7,49% para el tiempo de incubación y 4,73% para la temperatura de incubación). Para la formación de los ésteres metílicos y la permanencia de los ésteres originales, el resto de factores pudo eliminarse indicando que no había diferencias significativas (para un 95% de significación) entre los niveles estudiados.

El pH de la disolución durante la esterificación y la trans-esterificación demostró jugar un papel muy importante. La presencia de la forma aniónica de los ácidos era esencial para la formación de las sales de trimetilsulfonio así como para la saponificación previa en la trans-esterificación. Ambas reacciones, esterificación y trans-esterificación, eran incrementadas a un pH básico de 9 en la disolución, proporcionado por la adición de TMSH. Sin embargo, la presencia de 1% de ácido neutralizaba este medio básico, los ácidos no estaban en forma aniónica y el rendimiento de la metilación disminuía. Una disolución con 1% de ácido acético tenía un pH de 6 después de añadir el TMSH, mientras que si era ácido fosfórico, el pH disminuía hasta 2. La Tabla 2.8 muestra claramente el efecto del pH. Todos los experimentos desarrollados al mismo pH tienen resultados parecidos, independientemente de los niveles de los otros factores.

La contribución del error residual a la variabilidad de los datos (6,22%, 2,89% y 2,96%) indica la bondad del diseño experimental utilizado. El hecho de que este error sea menor del 15%, justifica que el diseño fue adecuado y tuvo cuenta todas las variables que afectaban a la respuesta, ya que la varianza experimental de los datos podía explicarse mediante los factores y sus interacciones. La Figura 2.16 muestra el efecto de los niveles de las variables en la respuesta. Se observa que todas las variables, a excepción del pH, influyen muy poco en la respuesta.

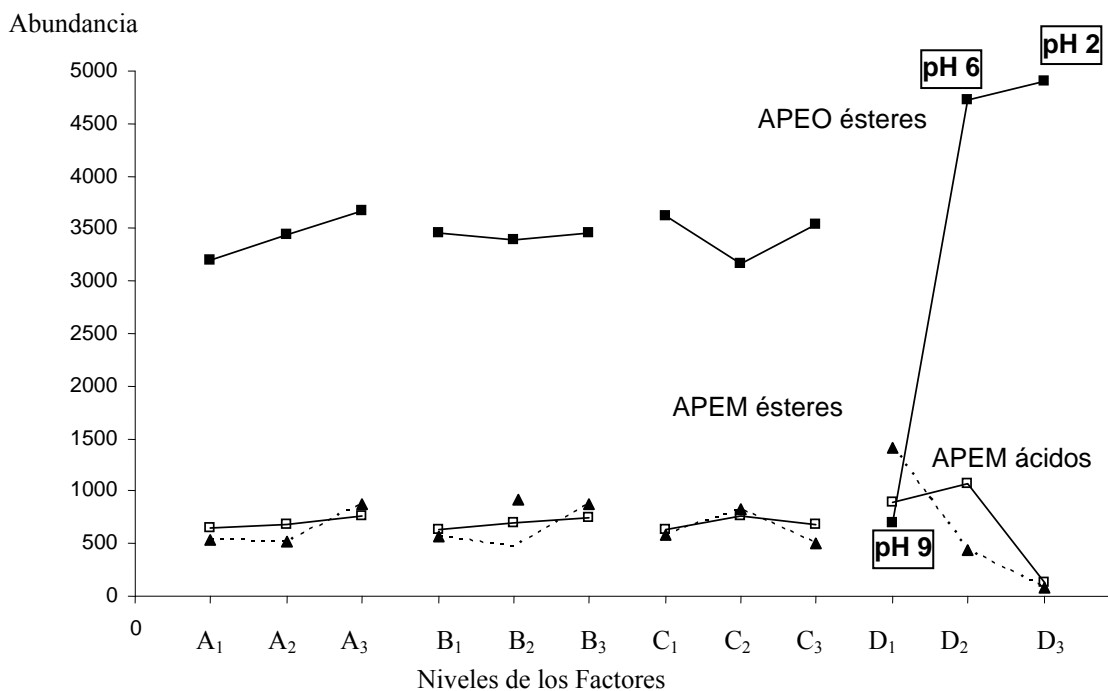


Figura 2.16. Comparación del efecto de la interacción de los factores en la respuesta para: los ésteres originales que permanecen (■), y los ésteres metílicos: en la Matriz Ácida (□), y en la Matriz Esterificada (▲).

Los valores de APEM y APEO son opuestos en la trans-esterificación ya que a medida que se forman los ésteres metílicos, disminuyen los ésteres originales a partir de los que se forman.

La formación de ésteres metílicos a partir de ambas reacciones de esterificación y trans-esterificación se vio afectada de igual manera por el pH. Disminuían a pH ácido, siendo la trans-esterificación la más afectada, ya que sólo se realizaba a pH básico y no a pH 2.

La máxima metilación de los herbicidas ácidos se obtuvo para D₂, 1% de ácido acético, valor de pH 6. Los otros tres factores no presentaron diferencias significativas, aunque el nivel A₃, acetonitrilo; B₃, 45 min de incubación; y C₂, 40°C, temperatura de incubación, proporcionaron un ratio un poco más alto. Con ácido fosfórico, la reacción de metilación casi no se producía, de lo que se deduce que la reacción se producía en medios básicos o neutros, pero no en aquellos fuertemente ácidos.

Como resultado se tomó el óptimo para los ácidos, ya que eran los que interesaba esterificar al máximo, siendo la trans-esterificación un fenómeno colateral. Cualquier disolvente orgánico acidificado con 1% de ácido acético era adecuado para que se produjera la metilación, y como el precalentamiento no incrementaba la reacción, sólo era necesario añadir el reactivo derivatizante al vial de la muestra y la metilación se producía directamente en el inyector del GC-MS.

Porcentajes de esterificación y trans-esterificación

Se estudiaron los porcentajes de trans-esterificación y esterificación para aquellos herbicidas que podían estar presentes en forma de ésteres y sus correspondientes ácidos. Únicamente se usó acetona ya que se demostró que el disolvente no contribuía significativamente a las derivatizaciones. De la misma manera no se probó en medio fuertemente ácido (con fosfórico) porque inhibía ambas reacciones.

Se compararon los patrones de herbicidas ácidos o ésteres originales disueltos en el disolvente ensayado a una concentración de 250 µg/l y derivatizados según el procedimiento optimizado, con los patrones sin derivatizar de los ésteres metílicos y de los ésteres originales, en cada caso, diluídos en las mismas condiciones y a la misma concentración. El Fenoxaprop p metil no pudo compararse y, por tanto, no se muestran sus resultados en la Tabla 2.10.

Ambas esterificación y trans-esterificación fueron menores en un medio ligeramente acidificado que a pH básico. La mayoría de los herbicidas ácidos estudiados pertenecían a la familia de los Fenoxiácidos y al tener estructuras similares, proporcionaban ésteres metílicos similares con altos porcentajes de esterificación. Sin embargo, los herbicidas Hidroxibenzonitrilos (Bromoxinil e Ioxinil) se hidrolizaron a ácidos carboxílicos, vía amidas, tras el calentamiento, proceso favorecido por el medio básico producido por el TMSH. Como resultado, se producían menores rendimientos en la producción de ésteres metílicos y los ésteres octanoicos se perdían al derivatizar en acetona sin acidificar. El Flamprop isopropil se trans-esterificó poco debido a su gran tamaño molecular que causaba interacciones estéricas. El Fenoxaprop sólo se encontró en los experimentos llevados a cabo con acetona acidificada porque el anillo del benzoxazol se abría en medio básico. Además, el Fenoxaprop p metil sólo se formaba a partir de la derivatización del ácido y no a partir de la trans-esterificación del Fenoxaprop p etil. Esto es debido a que los ésteres pequeños no trans-esterificaban bien al ser la reacción un equilibrio y no estar lo suficientemente desplazada.

Tabla 2.10. Porcentajes de esterificación y trans-esterificación (%) (n=3) en medio básico (acetona – Ac) y ligeramente ácido (acetona con 1% de ácido acético – Ac + 1%HAc).

Herbicida Esterificado ÁCIDOS	Ac		Ac + 1% HAc		Herbicida Trans-Esterificado ÉSTERES	Ac		Ac + 1% HAc	
	%	%CV	%	%CV		%	%CV	%	%CV
Bromoxinil metil	18,7	8,5	34,4	9,3	Bromoxinil metil	11,6	5,0	6,5	11,8
					Bromoxinil octanoato			59,3	6,3
Diclofop metil	82,9	6,2	76,4	3,4					
Fenoxaprop p metil					Fenoxaprop p metil				
					Fenoxaprop p etil			91,8	3,5
Flamprop metil	92,1	2,1	84,0	1,5	Flamprop metil	23,9	7,5	5,1	8,6
					Flamprop isopropil	71,5	4,5	91,8	3,7
Ioxinil metil	17,5	2,5	20,9	0,5	Ioxinil metil	11,3	5,6	7,2	5,4
					Ioxinil octanoato			40,2	6,5
MCPA metil	90,7	6,7	69,1	9,6	MCPA metil	85,8	0,1	21,7	6,7
					MCPA tioetil			96,9	5,2
MCPP metil	106,0	1,0	93,4	6,1	MCPP metil	67,7	6,9	16,5	8,0
					MCPP isocítilico			95,9	4,1

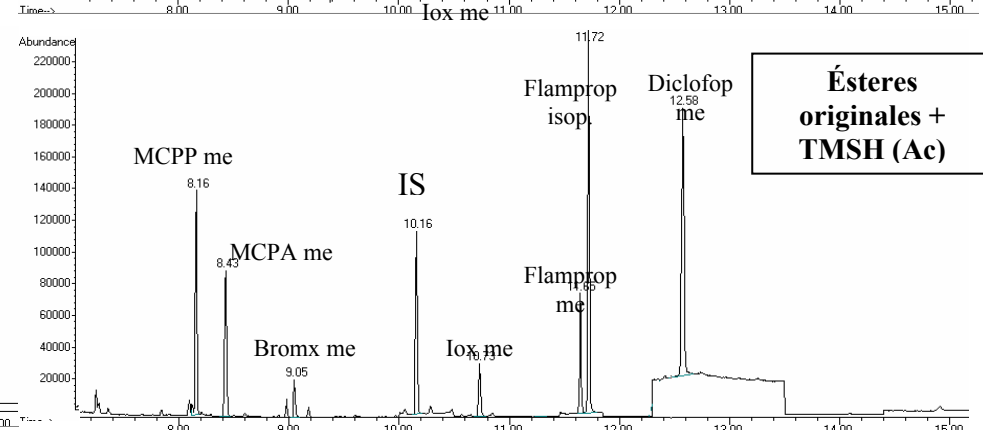
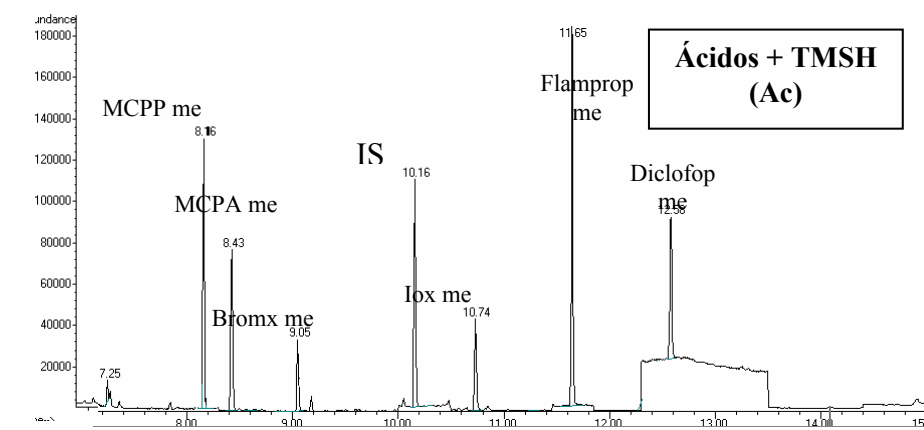
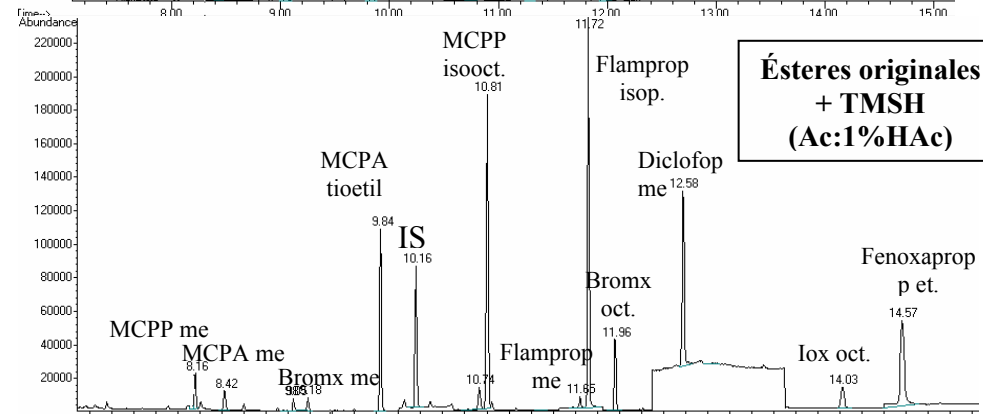
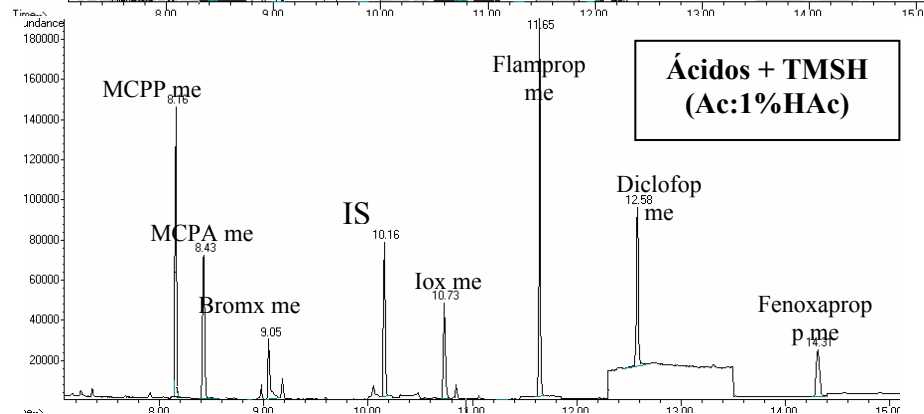
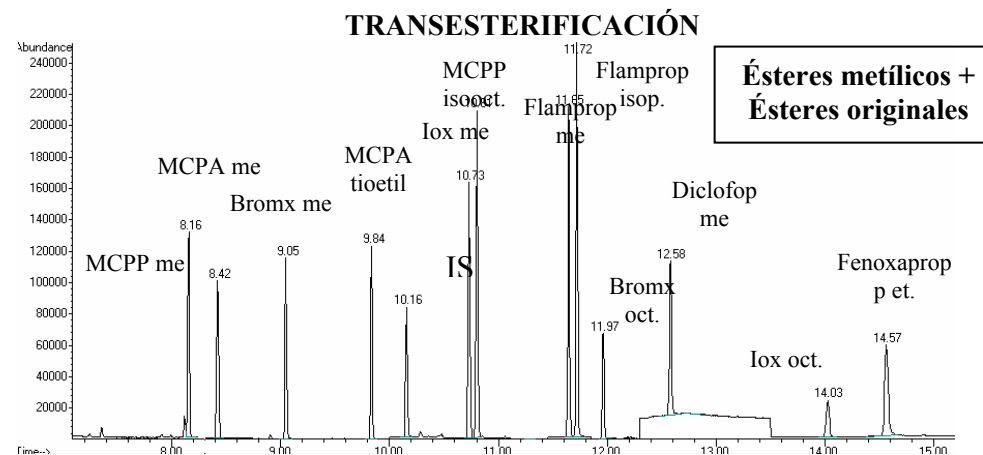
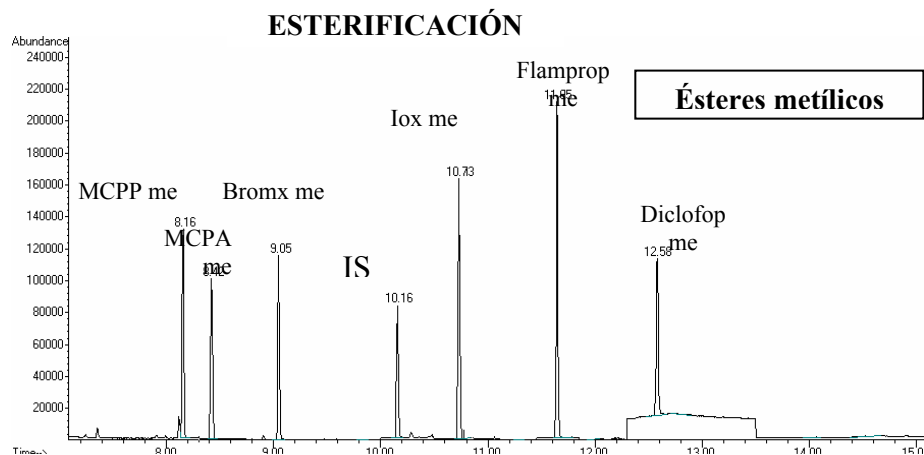


Figura 2.17. Cromatogramas de los herbicidas Ácidos y los Ésteres originales derivatizados en acetona y acetona acidificada y comparados con sus correspondientes ésteres metílicos y originales sin derivatizar.

En la Figura 2.17 se muestran cromatogramas de los patrones de ácidos y ésteres originales derivatizados en acetona y acetona acidificada con 1% de ácido acético, comparados con disoluciones de los correspondientes ésteres metílicos y originales sin derivatizar. Se observa que al pH escogido (con acético) la trans-esterificación será pequeña (< 20%, normalmente en torno al 10%), y la esterificación será alta (en torno al 70-90%, excepto para el Ioxinil y el Bromoxinil, que está en torno al 30%), por lo que la mayor parte de los ésteres metílicos se deberán a la esterificación de los ácidos y permanecerán muchos ésteres originales.

2.3.3.5. Adición de Modificadores

El uso del ácido acético tiene un efecto protector de los analitos frente a su degradación en el sistema de inyección. Interacciona con los sitios activos de éste y de la columna, principalmente los que forman enlaces por puentes de hidrógeno, mejorando las respuestas de los analitos susceptibles de termodegradarse, y posibilitando su análisis por GC [86]. Este efecto es especialmente importante para las fenilureas ya que minimizaba su descomposición térmica [56]. También estabiliza aquellos herbicidas que se degradan en condiciones básicas, sin afectar al resto de herbicidas, como se vio en el apartado anterior para los hidroxibenzonitrilos.

El efecto del ácido acético se apreció ya que algunos picos de herbicidas problemáticos de los Grupos I y II aparecían más simétricos y afilados (fenilureas, sulfonilureas y Bifenox, señalados en la Figura 2.18). Se comprobó, además, que el uso de este ácido no afectaba a la fase estacionaria, que suele ser atacada por ácidos más fuertes [86], por lo que los patrones de herbicidas se prepararon siempre en acetona acidificada con 1% de ácido acético.

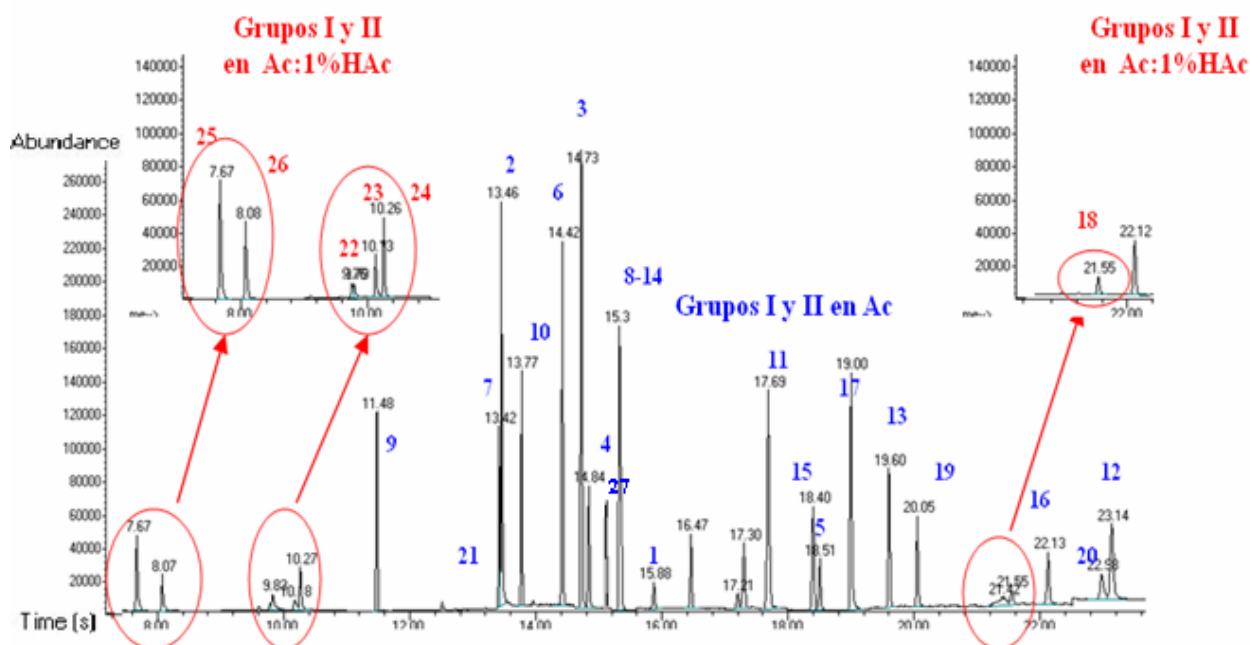


Figura 2.18. Cromatograma de los herbicidas de los Grupos I y II en Acetona. Cromatograma de los herbicidas de los Grupos I y II en Acetona acidificada con 1% de Ácido Acético. Los herbicidas se han numerado como en la Tabla 2.6.

2.3.3.6. Validación

Identificación

Según el Documento N° SANCO 10232/2006 [77], y la Decisión 2002/657/CE de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, la identificación del pico se hará en base al cumplimiento de los siguientes parámetros:

1. Tiempo de retención relativo: La relación entre el tiempo de retención cromatográfico del analito y el del patrón interno, es decir, el tiempo relativo de retención del analito, corresponderá al de la disolución de calibración, con un margen de tolerancia de $\pm 0,5\%$ para GC.
2. Para el análisis por GC-MS en modo SIM: se exige la presencia de 1 ión cuantificador, preferiblemente el ión molecular, y 2 iones cualificadores ($m/z > 100$). El ión cuantificador suele ser el más abundante, aquel que no tiene interferencias cromatográficas y presenta la mayor relación señal/ruido. Los iones cualificadores no deben provenir de la misma parte de la molécula y se admitirán iones con $m/z < 100$ en casos especiales, como para los Hidroxibenzonitrilos.
3. Relación de las abundancias: la intensidad de los ratios de los iones escogidos debe estar dentro de unas tolerancias [77]: si la intensidad del pico es mayor del 50%, tolerancia de $\pm 10\%$; del 20-50%, $\pm 15\%$; del 10-20%, $\pm 20\%$; y menores del 10%, $\pm 50\%$.

Linealidad, Límite de Detección instrumental

Se obtuvieron calibrados lineales para todos los compuestos analizados por GC-MS en todo el rango (10-500 $\mu\text{g/l}$) a seis niveles (Tabla 2.11), los datos se han calculado a partir del promedio de 5 repeticiones. En todos los calibrados de los productos de degradación de las ureas (en disolvente y en matriz) se demostró la linealidad de las respuestas, con lo cual se deduce que la cuantificación con sus productos de degradación es cuantitativa y su uso es adecuado [93-95].

Se realizaron calibrados con los ácidos y los ésteres originales derivatizados en acetona acidificada con 1% de ácido acético demostrando que la conversión de los ácidos/fenoles a sus ésteres/éteres metílicos correspondientes era cuantitativa en el rango ensayado (10-500 $\mu\text{g/l}$) a seis niveles.

Cuantificación

Para mejorar la especificidad de la detección, únicamente se utilizaron para cuantificar los iones “*target*”, también llamados cuantificadores, ya que son los más abundantes y característicos. La concentración de los analitos se determinaba comparando las áreas de los picos de las muestras con las encontradas en el análisis de patrones de herbicidas de concentración conocida analizados en las mismas condiciones. Las concentraciones de los analitos se deducían a partir de las respuestas relativas producidas por el patrón interno ya que se detectaba adecuadamente y sin interferencias. Su uso evitaba las incertidumbres producidas en la inyección y conseguía una mayor precisión, pero nunca se utilizó para aplicar correcciones [97]. Para el análisis de las muestras problema se añadía la misma cantidad de patrón interno que la añadida a las disoluciones patrón, se inyectaba en el sistema cromatográfico y se determinaba la relación de áreas, que se llevaba a la curva de calibrado correspondiente.

La cuantificación con un patrón interno y un calibrado lineal se realizaba con la siguiente fórmula, donde a es la ordenada en el origen, b es la pendiente, i es cada herbicida y PI es el patrón interno:

$$\frac{Area_i}{Area_{PI}} = a + b \frac{Conc_i}{Conc_{PI}}$$

Tabla 2.11. Parámetros de Validación para los herbicidas de los Grupos I, II y III. Se han subrayado los valores que no cumplen los criterios.

Grupo	Nº	Herbicida	T. Retención (min)	%CV T. Retención	Coef. Linealidad	%CVfr	LD Instrum. (mg/l)
I	1	Cianazina	15,87	0,05	95,9	8,5	0,15
	2	Terbutilazina	13,46	0,02	98,0	9,8	0,09
	3	Terbutrina	14,72	0,06	97,7	6,5	0,08
	4	Metribuzina	14,84	0,03	97,9	9,4	0,08
	5	Carfentrazona etil	18,50	0,00	96,6	7,7	0,12
	6	Prosulfocarb	14,42	0,01	97,8	12,2	0,08
	7	Trialato	13,42	0,00	97,9	13,2	0,09
	8	Pendimetalina	15,35	0,02	96,1	9,3	0,14
	9	Trifluralina	11,50	0,02	96,3	6,7	0,13
	10	MCPA tioetil	13,77	0,02	97,4	8,2	0,09
	11	Flamprop isopropil	17,68	0,02	97,4	10,3	0,10
	12	Fenoxaprop p etil	23,12	0,01	<u>93,9</u>	9,8	0,22
	13	Diclofop metil	19,60	0,04	97,5	7,7	0,09
	14	MCPP isooctílico	15,32	0,01	96,6	5,9	0,12
	15	Bromoxinil octanoato	18,40	0,05	97,0	13,1	0,33
	16	Ioxinil octanoato	22,12	0,08	96,0	11,0	0,38
	17	Diflufenican	18,98	0,01	95,4	6,8	0,17
	18	Bifenox	21,55	0,02	95,7	8,7	0,40
	19	Mefenpir dietil	20,05	0,03	95,9	4,6	0,13
	20	Tralkoxidim	22,93	0,02	96,8	6,4	0,12
	21	Metabenzotiazuron	13,45	0,06	96,3	14,0	0,14
II	22	Amidosulfuron	9,75	0,06	95,7	12,6	0,16
	23	Tribenuron metil	10,14	0,06	97,7	13,3	0,08
	24	Metoxuron	10,26	0,02	95,6	8,3	0,16
	25	Isoproturon	7,67	0,01	97,3	9,4	0,10
	26	Clortoluron	8,08	0,02	98,6	10,5	0,06
	27	Linuron	15,00	0,02	98,7	13,4	0,22
	III	1	2,4-D metil	8,91	0,08	<u>93,8</u>	<u>22,8</u>
2		Bromoxinil metil	9,05	0,01	96,2	13,2	0,23
3		Bromoxinil octanoato	11,96	0,02	99,8	<u>23,7</u>	0,24
4		Dicamba metil	8,21	0,01	97,5	12,2	0,25
5		Diclorprop p metil	8,60	0,02	96,0	6,7	0,37
6		Diclofop metil	12,58	0,02	99,0	13,8	0,50
7		Fenoxaprop p metil	14,31	0,04	97,8	7,3	0,24
8		Fenoxaprop p etil	14,57	0,02	97,1	6,3	0,34
9		Flamprop metil	11,65	0,05	96,7	<u>16,7</u>	0,33
10		Flamprop isopropil	11,72	0,02	99,3	5,9	0,20
11		Ioxinil metil	10,73	0,06	96,3	1,7	0,06
12		Ioxinil octanoato	14,03	0,03	95,0	10,0	0,43
13		MCPA metil	8,43	0,00	98,2	5,0	0,31
14		MCPA tioetil	9,84	0,08	97,5	5,7	0,28
15		MCPP metil	8,16	0,01	96,9	7,9	0,27
16		MCPP isooctílico	10,81	0,02	98,5	5,0	0,20
Criterios				< 0,5%	> 95%	< 15%	

Los patrones de los herbicidas del Grupo III se prepararon a partir de la mezcla de los herbicidas ácidos derivatizados de la misma manera que las muestras. Es lo que se llama patrones de procedimiento (*procedural standards*) [98-99].

2.3.4. PTV-GC-TOF/MS

2.3.4.1. Optimización de la Inyección

Los herbicidas se comportaron de tres maneras diferentes, como consecuencia de la prueba de retención en el *liner*. Las respuestas de la Trifluralina, el Trialato, la Terbutilazina, el Fenoxaprop p etil, la Cianazina y el Bifenox, fueron las mismas para los tres volúmenes de inyección utilizados. El Bromoxinil octanoato, el Ioxinil octanoato y el Linuron quedaron retenidos en el *liner* empaquetado de vidrio ya que sus respuestas fueron menores que en la inyección en *splitless*. El resto de herbicidas mostró un incremento en la respuesta.

Como resultado se escogió un volumen de inyección de 25 μ l, que necesitaba un venteo de 110 segundos. Proporcionaba la sensibilidad requerida y la mayoría de los compuestos no eran retenidos en el *liner*.

2.3.4.2. Optimización del programa de Temperaturas

El programa de temperaturas fue el siguiente: la temperatura inicial del horno se mantuvo a 40°C durante 2 min y después fue programado a 10°C/min hasta 280°C, donde se mantuvo 15 min.

2.3.4.3. Detección

Los espectros de masas de los herbicidas son iguales a los obtenidos por GC-MS, ya que también se usa impacto electrónico para ionizar. Los herbicidas se identificaron a partir de los tiempos de retención y los espectros de masas de las librerías (NIST).

Se utilizó un algoritmo de deconvolución para reprocesar los cromatogramas en SCAN que proporciona el detector TOF para no perder información espectral (Figura 2.19).

2.3.4.4. Validación

Los parámetros de validación se determinaron sobre 5 repeticiones de calibrados preparados en acetonitrilo en el rango (2,5-100 μ g/l) a cuatro niveles (Tabla 2.12).

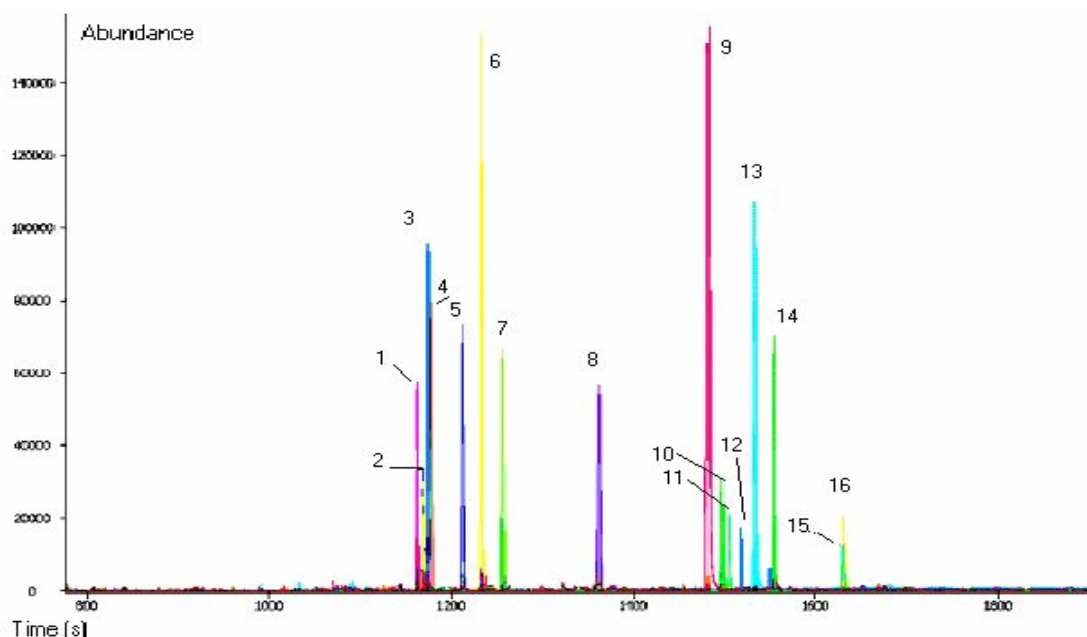


Figura 2.19. Cromatograma de los herbicidas analizados por PTV-GC-TOF/MS. Los analitos se han numerado como en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12. Características de análisis y parámetros de validación para los herbicidas analizados por PTV-GC-TOF/MS. Se han subrayado los valores que no cumplen los criterios.

Nº	Analito	Ión Cuantificador	Tiempo Retención (seg)	%CV Tiempo Retención	Coef. Lin.	%CVfr	LD Instrum. (µg/l)
1	Trifluralina	306,1	1164	0,09	99,5	8,9	1,18
2	Trialato	268,1	1169	0,01	99,2	10,2	1,79
3	Terbutilazina	214,1	1174	0,04	99,6	12,5	0,99
4	MCPA tioetil	125,1	1177	0,08	99,6	13,4	0,99
5	Metribuzina	198,0	1211	0,01	99,8	11,6	0,55
6	Prosulfocarb	128,1	1232	0,02	99,4	13,2	1,44
7	Terbutrina	226,1	1256	0,01	99,1	12,1	2,22
8	Pendimetalina	252,0	1362	0,04	99,0	11,1	2,31
9	Flamprop isopropil	105,1	1481	0,02	99,5	10,2	1,18
10	Diclofop metil	253,0	1497	0,01	98,3	12,6	3,92
11	Bromoxinil octanoato	127,1	1503	0,02	97,8	<u>16,5</u>	5,22
12	Carfentrazona etil	312,1	1522	0,07	99,0	2,9	2,39
13	Diflufenican	266,1	1532	0,02	99,3	9,8	1,55
14	Mefenpir dietil	253,0	1553	0,06	98,8	11,4	2,93
15	Ioxinil octanoato	127,1	1628	0,02	96,7	10,7	7,87
16	Fenoxaprop p etil	288,1	1630	0,09	96,8	9,6	7,67
Criterios				< 0,5%	> 95%	< 15%	

2.3.5. LC-(ESI)-MS/MS

Esta técnica, debido a su versatilidad, permitió el análisis de prácticamente todo el conjunto de herbicidas utilizados en cebada, incluyendo aquellos analitos problemáticos en GC-TOF/MS, ya se retuvieran o vieran incrementadas sus respuestas en la inyección. Desafortunadamente el análisis del Bromoxinil octanoato y el Ioxinil octanoato no fue posible por esta técnica, y sólo se analizaron por GC-TOF/MS.

2.3.5.1. Optimización del Gradiente de la Fase Móvil

Las muestras se preparaban tomando alícuotas de 250 μl , a las que se añadía 250 μl de agua y se filtraban previamente a su análisis. Se usaron volúmenes de inyección de 50 μl para los compuestos detectados en modo positivo y 25 μl para los que se detectaban en modo negativo.

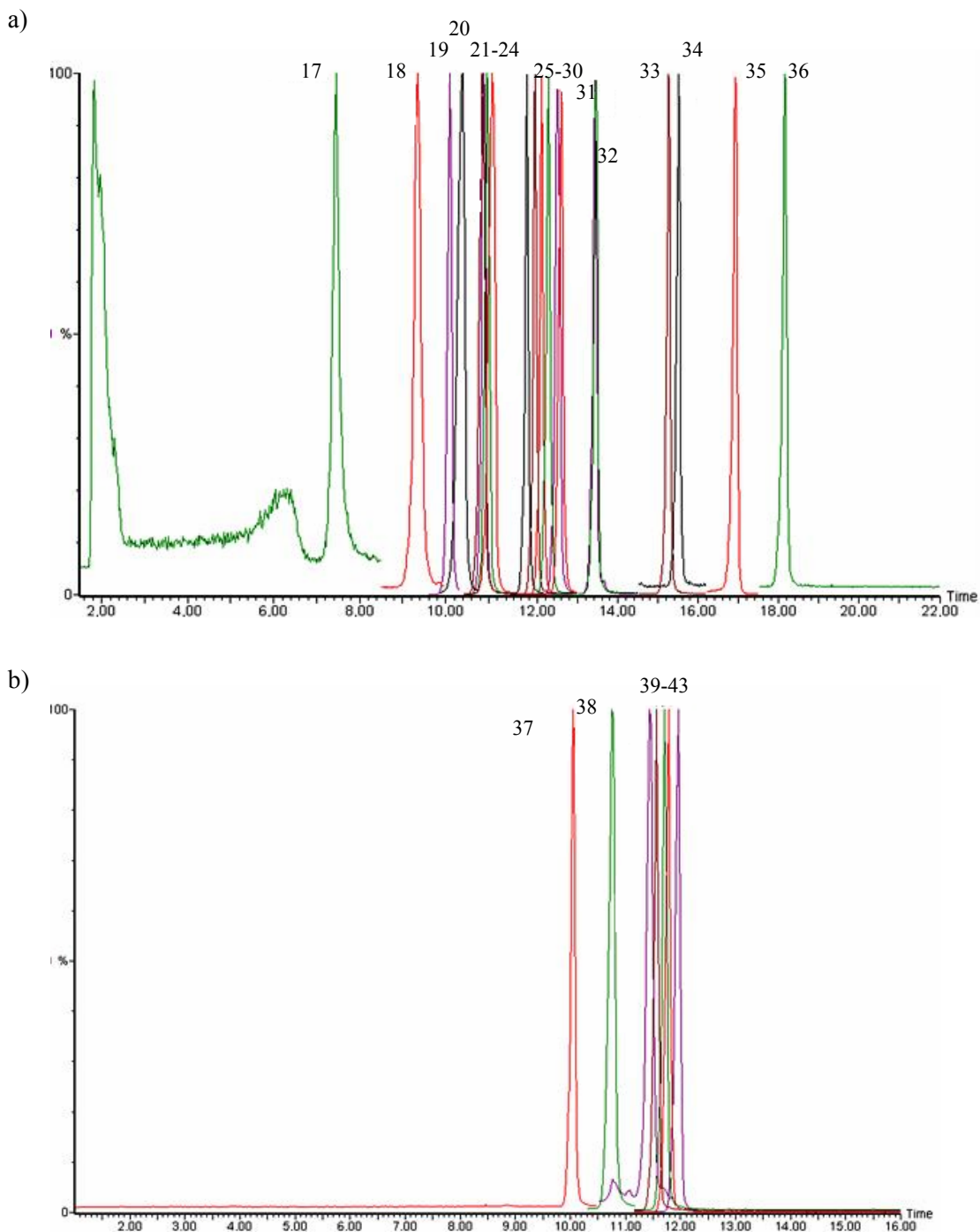


Figura 2.20. a) Cromatograma de los herbicidas analizados por LC-ESI-MS/MS con ionización positiva, y b) Cromatograma de los herbicidas analizados por LC-ESI-MS/MS con ionización negativa. Los analitos se han numerado como en la Tabla 2.13.

Para optimizar la separación cromatográfica de todos los herbicidas, se utilizaba una fase móvil formada por dos disolventes: disolvente A (agua:metanol, 95:5) y disolvente B (agua:metanol, 5:95), ambos conteniendo ácido fórmico 5 mM. Para los compuestos que se detectaban con ionización positiva, el porcentaje de disolvente B se variaba de la siguiente manera: 0-1 min, 20%; 1-8 min, 75%; 13 min, 100% mantenido 3 min; 16-16,3 min, 20% mantenido 5,7 min, a flujo constante de 0,4 ml/min (Figura 2.20a). Los compuestos detectados con ionización negativa, se analizaban con el siguiente gradiente: el porcentaje de disolvente B cambiaba de la siguiente manera: 0-1 min, 20%; 1-8 min, 100%; 9-9,5 min, 20% mantenido 5,5 min, a flujo constante de 0,4 ml/min (Figura 2.20b).

2.3.5.2. Detección

Los espectros de masas de los herbicidas eran diferentes de los anteriores porque se usaban interfases y modos de ionización diferentes a los de GC. El MS se utilizó en modo *single reaction monitoring* (SRM), técnica en la que se detectaba sólo una transición (el ión precursor y el ión de ruptura), que se analizaba para cada herbicida con un *dwell time* de 50 ms. El uso de otra transición para confirmar los analitos implicaba el uso de más canales y de desarrollos cromatográficos más largos, por lo que no se consideró conveniente.

Tabla 2.13. Características de análisis para los herbicidas analizados por LC-MS/MS.

Nº	Compuesto	Polaridad	Tiempo Retención (min)	Ión Precursor (m/z)	Energía Cono/V	Energía Colisión/eV	Transición (m/z)
17	Difenzoquat metil sulfato	ESI+	7,43	249,0	30	35	130,0
18	Clopiralida	ESI+	9,13	192,0	30	20	146,0
19	Florasulam	ESI+	10,06	360,3	35	20	1289
20	Metoxuron	ESI+	10,38	229,0	30	20	72,0
21	Cianazina	ESI+	10,84	241,3	30	18	214,0
22	Triasulfuron	ESI+	10,88	402,0	30	18	166,9
23	Tifensulfuron metil	ESI+	10,96	388,1	25	15	166,9
24	Imazametabenz metil	ESI+	11,08	289,3	30	25	160,9
25	Clorsulfuron	ESI+	11,74	358,2	30	18	140,8
26	Amidosulfuron	ESI+	11,92	370,1	20	15	260,8
27	Tribenuron metil	ESI+	12,10	396,1	20	12	154,9
28	Clortoluron	ESI+	12,28	213,0	30	20	72,0
29	Metabenzotiazuron	ESI+	12,49	222,3	25	15	164,9
30	Isoproturon	ESI+	12,58	207,0	30	20	72,0
31	Isoxaben	ESI+	13,42	333,0	30	20	165,0
32	Linuron	ESI+	13,46	249,0	30	20	160,0
33	Fenclorazol etil	ESI+	15,26	404,0	35	20	357,8
34	Bifenox	ESI+	15,51	342,2	20	10	309,9
35	Tralkoxidim	ESI+	16,92	330,4	25	12	284,1
36	Piridato	ESI+	18,14	207,0	60	18	103,8
37	Fluroxipir	ESI-	10,05	253,0	15	15	195,0
38	Bentazona	ESI-	10,78	239,0	20	25	197,0
39	Dicamba	ESI-	11,47	221,0	30	10	177,0
40	MCPA	ESI-	11,56	201,0	30	15	143,0
41	2,4-D	ESI-	11,71	219,0	15	12	161,0
42	MCPPP	ESI-	11,79	213,00	30	20	141,0
43	Diclorprop p	ESI-	11,96	233,0	20	12	161,0

En la ionización en modo positivo (ESI+) se podían formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$, siendo n el número de protones cargados positivamente en la molécula. En modo (ESI-) se producía normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar iones $[M-nH]^{n-}$. La distinta naturaleza de los herbicidas seleccionados y sus diferentes propiedades ácido-base, influyeron para que 7 de los 27 herbicidas analizados por LC-MS/MS, presentasen ionización negativa (los Fenoxiácidos) detectándose como $[M-H]^-$, mientras que el resto prefiriesen la ionización positiva, detectándose como $[M+H]^+$ (Tabla 2.13).

2.3.5.3. Validación

Los parámetros de validación se determinaron con el promedio de 5 repeticiones de calibrados preparados en acetonitrilo en el rango (2,5-100 µg/l) a cuatro niveles (Tabla 2.14).

En el caso de aquellos herbicidas que eran analizables por ambas técnicas, LC-(ESI)-MS/MS fue la técnica escogida, como por ejemplo, para las Sulfonilureas y Fenilureas, frente a la cuantificación de sus productos de degradación térmica con PTV-GC-TOF/MS.

Tabla 2.14. Parámetros de validación para los herbicidas analizados por LC-(ESI)-MS/MS. Se han subrayado los valores que no cumplen los criterios.

Nº	Analito	Tiempo Retención (min)	%CV Tiempo Retención	Coef. Linealidad	%CVfr	LD Instrum. (µg/l)
17	Difenzoquat metil sulfato	7,43	0,01	95,8	11,6	10,03
18	Clopiralida	9,13	0,05	99,6	2,5	1,04
19	Florasulam	10,06	0,04	98,8	8,1	2,93
20	Metoxuron	10,38	0,01	98,4	6,8	3,82
21	Cianazina	10,84	0,01	99,3	2,2	1,61
22	Triasulfuron	10,88	0,02	99,6	1,5	1,04
23	Tifensulfuron metil	10,96	0,02	99,7	2,1	0,62
24	Imazametabenz metil	11,08	0,03	99,4	3,4	1,50
25	Clorsulfuron	11,74	0,01	99,0	1,9	2,43
26	Amidosulfuron	11,92	0,04	99,5	2,8	1,22
27	Tribenuron metil	12,10	0,08	99,5	4,9	1,10
28	Clortoluron	12,28	0,09	98,7	7,8	3,02
29	Metabenzotiazuron	12,49	0,07	99,4	4,2	1,30
30	Isoproturon	12,58	0,01	95,3	14,3	14,30
31	Isoxaben	13,42	0,01	96,3	12,6	16,12
32	Linuron	13,46	0,03	98,3	6,2	4,13
33	Fenclorazol etil	15,26	0,05	99,3	0,8	1,54
34	Bifenox	15,51	0,06	98,4	2,9	3,72
35	Tralkoxidim	16,92	0,05	96,2	12,1	7,13
36	Piridato	18,14	0,07	99,3	<u>18,5</u>	1,31
37	Fluroxipir	10,05	0,01	98,0	4,8	4,80
38	Bentazona	10,78	0,05	95,1	7,8	14,03
39	Dicamba	11,47	0,06	96,1	13,0	9,70
40	MCPA	11,56	0,02	97,2	13,2	6,54
41	2,4-D	11,71	0,02	99,5	3,9	1,12
42	MCP	11,79	0,03	96,3	14,0	8,63
43	Diclorprop p	11,96	0,05	99,0	6,4	2,50
Criterios			< 0,5%	> 95%	< 15%	

Las concentraciones de los analitos en ambas técnicas PTV-GC-TOF/MS y LC-(ESI)-MS/MS se deducían a partir de su respuesta relativa a la producida por el patrón interno (PCB-198), añadido antes del análisis para controlar la cantidad de analitos que pasaban a la columna.

2.3.6. COMPARACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Se presenta la Tabla 2.15 a modo de resumen la comparativa de las técnicas estudiadas.

Tabla 2.15. Comparación de las diferentes técnicas de análisis utilizadas.

Equipo	Analitos	Observaciones	Calibrado (ppm)	%Coef. Lineal.	LD (ppm)	%CVfr
HPLC-DAD	Grupo I, II	Falta de Selectividad y Sensibilidad, Solapamiento				
GC-AED	Grupo I, II	Falta de Sensibilidad	0,25 - 5	> 95	1-0,4	< 15
GC-MS	Grupo I, II, III	Muy robusto	0,05 - 0,5	> 95	0,05-0,03	< 15
PTV-GC-TOF/MS	Grupo I, II	Información estructural Identifica analitos "no target"	0,0025 - 0,1	> 95	0,008-0,0005	< 15
LC-(ESI)-MS/MS	Grupo I, II, III, +	Muy versátil	0,0025 - 0,1	> 95	0,010-0,0005	< 15

HPLC no permitió separar todos los herbicidas de ensayo ya que el detector DAD no tenía la suficiente selectividad para distinguir los analitos en función de sus longitudes de onda de máxima absorción. La técnica de HPLC era muy sensible a las interferencias extraídas de la matriz, haciendo especialmente difícil el análisis de los herbicidas ácidos. Sin embargo, los análisis por GC no estaban afectados por las interferencias de la matriz de manera tan acusada.

Todos los equipos de GC usados y el LC-(ESI)-MS/MS proporcionaban linealidades adecuadas, pero el GC-AED no proporcionaba LD aceptables, es decir, por debajo de los LMRs propuestos para las matrices que se estudiaron más adelante. Para conseguir estos límites había que extraer mucha cantidad de muestra, lo que provocaba muchas interferencias y un mantenimiento constante del equipo analítico. Sin embargo, la ionización por EI en el análisis por GC-MS, producía numerosos fragmentos que proporcionaban mucha información estructural y, a su vez, el ruido de fondo era menor que con otras técnicas de ionización, lo que permitía bajar los LD hasta valores adecuados a los buscados para el análisis de residuos.

La principal ventaja de la disponibilidad de instrumentación sofisticada como GC-MS/MS y LC-MS/MS, era que permitía prestar poca atención a los procesos de limpieza del extracto, debido a la gran sensibilidad y selectividad de la detección, lo contrario que en otras técnicas de análisis. El inyector PTV era especialmente adecuado para analitos problemáticos ya que mejoraba las inyecciones de compuestos termodegradables en comparación con *pulsed splitless*.

LC-(ESI)-MS/MS fue el equipo más universal, demostrando su gran versatilidad, sensibilidad y selectividad, ya que fue la única técnica capaz de analizar prácticamente todos los herbicidas susceptibles de aplicarse en cebada. Desafortunadamente este equipo no estuvo disponible a lo largo de todo el desarrollo del trabajo, optimizándose el GC-MS, que proporcionaba peores LD, pero aceptables para los estudios realizados.

2.3.7. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

La presencia o ausencia de efecto matriz, se demostró comparando las respuestas producidas por el analito en una disolución de acetona, con la respuesta obtenida por la misma cantidad de analito en presencia del extracto de matriz, a los mismos niveles de calibración. La matriz era un suelo del que se detallarán sus características en el Capítulo 3. Se realizó este primer estudio para los herbicidas de los Grupos I y II, aunque en los Capítulos posteriores se aplicó a todos los analitos.

En la Tabla 2.16 se muestra el resultado de las 3 pruebas estadísticas para el estudio del efecto matriz cuando se extraían muestras de suelo con cuatro disolventes diferentes.

Se aprecia que el test del solapamiento de intervalos fue el menos restrictivo, lo contrario del test del ajuste a una línea. Esto era lógico teniendo en cuenta que los intervalos de confianza de las pendientes podían ser muy grandes y solaparse incluso si los valores de las pendientes para ambos calibrados estaban muy alejados. Sin embargo en el test de ajuste de una línea tenían que cumplirse dos condiciones (ordenada estadísticamente igual a cero y pendiente estadísticamente igual a uno) y era más difícil que se diesen ambos requisitos. Por tanto, es este test estadístico el que proporcionaba el estudio más exhaustivo del efecto matriz.

Tabla 2.16. Resultados de los 3 estudios estadísticos para evaluar el efecto matriz producido por la extracción de un suelo con diferentes disolventes. Las X indican la existencia de efecto matriz.

Nº	Herbicida	Acetona			Acetonitrilo			Acetato Etilo			Acetona:Hexano		
		Test t	Intv.	Línea	Test t	Intv.	Línea	Test t	Intv.	Línea	Test t	Intv.	Línea
1	Amidosulfuron	X	X	X	X		X						X
2	Isoproturon	X		X			X	X		X			X
3	Clortoluron	X		X				X		X			
4	Tribenuron m.			X			X			X	X	X	X
5	Metoxuron			X						X	X		X
6	Trifluralina				X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	Metabenzotiaz.				X		X	X	X	X			
8	Trialato	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	Terbutilazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	MCPA tioetil	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
11	Prosulfocarb	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
12	Terbutrina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
13	Metribuzina	X	X	X									
14	Linuron			X			X						
15	MCPP isooct.			X			X			X	X	X	X
16	Pendimetalina				X		X			X	X		X
17	Cianazina			X									X
18	Flamprop isop.	X	X	X	X		X	X		X	X		X
19	Bromoxinil oct.						X	X		X			X
20	Carfentraz. e.												
21	Di flufenican			X			X						X
22	Diclofop metil	X	X	X	X		X			X	X	X	X
23	Mefenpir dietil	X	X	X			X						X
24	Bifenox				X	X	X	X	X	X	X	X	X
25	Ioxinil oct.						X			X			X
26	Tralkoxidim							X		X	X	X	X
27	Fenoxaprop p e.												

El mayor efecto matriz se producía en el nivel más bajo del calibrado, lo que indicaba que era el nivel donde la señal se empezaba a confundir con el ruido.

El disolvente que produjo efecto matriz para el mayor número de herbicidas fue la mezcla de acetona y hexano, ya que la combinación de un disolvente polar (acetona) y uno apolar (hexano) aumentaba la extracción de interferentes de distintas características desde la matriz.

A pesar de que el modo SIM de detección era mucho más selectivo que el modo SCAN, se demostró que para la mayoría de herbicidas seguía existiendo efecto matriz. Por lo tanto, el uso de SIM no aseguraba la falta de interferencias y no se podía obviar el estudio del efecto matriz para cada caso en particular.

Aunque estadísticamente se demuestre que no existe efecto matriz, siempre se usará el calibrado preparado sobre extractos blancos de matriz para minimizar la influencia de la matriz en la cuantificación, evitar las recuperaciones excesivamente altas, y porque representa mejor el estado real de las muestras.

2.4. CONCLUSIONES

Uso de diferentes técnicas analíticas

1. Se selecciona el GC-MS para el método multiresiduo porque proporciona una adecuada linealidad, y la suficiente selectividad y sensibilidad frente al HPLC-DAD, que no es capaz de separar los herbicidas ni distinguirlos en función de sus longitudes de onda de máxima absorción, o frente al GC-AED, que no alcanza límites de detección adecuados.
2. El análisis con PTV-GC-TOF/MS da información estructural sobre los compuestos y el sistema de inyección PTV mejora la inyección de los analitos problemáticos, pero es el LC-(ESI)-MS/MS el equipo más universal, demostrando su gran versatilidad, sensibilidad y selectividad ya que es la única técnica capaz de analizar simultáneamente casi todos los herbicidas susceptibles de aplicarse a cultivos de cebada, incluyendo el análisis de 11 herbicidas más que GC-MS.

Analitos

3. La cuantificación con los productos de degradación de los herbicidas derivados de la urea es cuantitativa y su uso adecuado. Las fenilureas generan productos de degradación específicos, mientras que las sulfonilureas producen uno común y otro específico seleccionado para el análisis.

Optimización de la Reacción de Derivatización

4. La derivatización de los herbicidas ácidos/fenoles con TMSH es rápida y fácil produciendo ésteres/éteres metílicos cuantitativos mediante la descomposición térmica de las sales de trimetilsulfonio formadas por la desprotonación de los analitos ácidos con el TMSH fuertemente básico. La descomposición térmica se lleva a cabo directamente en el inyector del sistema cromatográfico, no siendo necesaria la incubación. El TMSH produce derivados metílicos a partir de dos reacciones simultáneamente, por un lado esterifica los ácidos/fenoles, y por otro, trans-esterifica otros ésteres de los herbicidas, por medio de una saponificación.
5. Ambas reacciones de derivatización están muy influidas por el pH del medio, ya que la presencia de la forma aniónica de los ácidos es esencial para la formación de las sales de trimetilsulfonio y para la saponificación. La adición de TMSH proporciona un pH básico adecuado, pero el rendimiento de la metilación se ve prácticamente anulado con ácido fosfórico.
6. Los herbicidas Hidroxibenzonitrilos se hidrolizan a ácidos carboxílicos, vía amidas, tras el calentamiento, proceso favorecido por el medio básico proporcionado por el TMSH. El Fenoxaprop sólo se mantiene en presencia de ácido acético porque el anillo del benzoxazol se abre en medio básico.
7. La trans-esterificación de los ésteres conjugados a ésteres/éteres metílicos es un equilibrio y la formación del éster/éter más pequeño está favorecida, lo que explica que el Flamprop isopropil, y el Fenoxaprop p etil se trans-esterifiquen en pequeña medida.

Uso del Ácido Acético

8. El ácido acético tiene un efecto protector al interaccionar con los sitios activos de la inyección y de la columna, aumentando las respuestas de algunos herbicidas, como los termodegradables (los derivados de la urea), facilitando el análisis por GC y sus calibrados cuantitativos. Asimismo estabiliza a los hidroxibenzonitrilos y al

Fenoxaprop, que se degradan en condiciones básicas, mejorando la reacción de derivatización en su presencia.

9. Como resultado de las ventajas del ácido acético, los extractos siempre se disuelven en una mezcla de acetona que lo contiene, por lo que la derivatización se produce en un medio ligeramente acidificado para el que la trans-esterificación es muy pequeña (< 20%, normalmente en torno al 10%) y la esterificación es alta, por lo que la mayor parte de los ésteres metílicos se producen a partir de la esterificación de los ácidos.

Estudio del Efecto Matriz

10. Si se quiere realizar un estudio estadístico exhaustivo del efecto matriz, tiene que aplicarse el test de ajuste a una línea, que es el más restrictivo, al contrario del test del solapamiento de intervalos.
11. Aunque estadísticamente se demuestre que no existe efecto matriz, siempre se usa el calibrado preparado sobre extractos blancos de matriz para minimizar la influencia de ésta en la cuantificación, evitar las recuperaciones excesivamente altas, y porque representa mejor el estado real de las muestras.

Método Optimizado

12. Por tanto, las muestras a analizar por GC-MS se disuelven en acetona:1% de ácido acético, y se dividen en dos alícuotas previa filtración con filtro orgánico de 0,45 micras y adición del patrón interno:
 - En la primera alícuota de 500 µl de extracto se analizan los herbicidas de los Grupos I, II (productos de degradación) y los ésteres conjugados del Grupo III (incluidos en el Grupo I, ya que son cromatografiados por GC). Los patrones se preparan con la mezcla completa de herbicidas.
 - A la segunda alícuota de 500 µl de extracto se le añaden 100 µl de TMSH 0,25M y la derivatización se produce directamente en el inyector del sistema cromatográfico. Sirve para los herbicidas ácidos y sus correspondientes ésteres (Grupo III). Los patrones se preparan a partir de los ácidos derivatizados de la misma manera que las muestras. Se usa una columna diferente para las alícuotas derivatizadas.

Se obtiene así, un método rápido en el cual sólo hace falta añadir el TMSH al vial del extracto a analizar y la derivatización se produce directamente en el inyector.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

1. B. García del Castillo. "Cromatografía Líquida de Alta Resolución". Editorial Limusa. 1988.
2. P.W. Lee (Ed.). "Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals", John Wiley & Sons Ltd. 2003.
3. M. Godula, J. Hajslova, K. Mastouska, J. Krivankova. *J Sep. Sci.* 24-5 (2001) 355.
4. K. Mastovska. "Food & Nutritional Analysis: pesticide residues". "Encyclopedia of Analytical Science". P. Worsford, A. Townshead, C. Poole (Eds.). Academic Press. 2004.
5. J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martin. *J Chromatogr. A* 754 (1-2) (1996) 245.
6. S. de Koning, G. Lach, M. Linkerhagner, R. Loscher, P. H. Tablack, U. A. Th. Brinkman. *J Chromatogr. A* 1008 (2003) 247.
7. A.R. Fernández-Alba, A. Aguera, L. Piedra. "Determination of pesticide residues in fruits and vegetables by LC-MS after applying conventional solvent extraction methods". 10as. Jornadas de Análisis Instrumental. Barcelona. 2002.
8. F. Menzinger, P. Schmitt-Kopplin, D. Freitag, A. Kettrup. *J Chromatogr. A* 891 (1) (2000) 45.
9. G. Hegedus, I. Belai, A. Szekacs. *Anal. Chim. Acta* 421 (2000) 121.
10. U.I. Garinella, G.K. Stearman, M.J. Wells. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5874.
11. S.Y. Kim, Y.A. Jo, J. Choi, M.J. Choi. *Microchem. J.* 68 (2-3) (2001) 163.
12. C. Wittmann, P.Y. Schreiter. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2733.
13. K.L. Hollaway, R.S. Kookana, D.J. McQuinn, M.R. Moerkerk, D.M. Noy, M.A. Smal. *Weed Res.* 39 (5) (1999) 383.
14. A.G. Hay, J.F. Rice, B.M. Applegate, N.G. Bright, G.S. Sayler. *Appl. Environ. Microb.* 66 (10) (2000) 4589.
15. C. Botre, F. Botre, F. Mazzei, E. Podesta. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (12) (2000) 2876.
16. C. de Liñán. "Vademécum". Ed. Agrotécnicas S.L. Madrid. 2002.
17. J.J. Guitián. "Registro de Productos Fitosanitarios". Departamento de Pesticidas. Subdirección General de Medios de Producción Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Recurso electrónico. 2002-2007.
18. S. Mitra (Ed.). "Sample preparation techniques in analytical chemistry". Wiley. 2003.
19. "The FOOTPRINT Pesticide Properties DataBase". Database collated by the University of Hertfordshire as part of the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704). 2006.
20. C.D.S. Tomlin (Ed.), "The Pesticide Manual", Version 2.1. British Crop Protection Council, Farnham. 2001.
21. E. Leitis, D.G. Crosby. *J. Agric. Food Chem.* 22 (1974) 842.

22. U.I. Garimella, G.K. Stearman, M.J.M. Wells. *J. Agric. Food Chem.* 48 (12) (2000) 5874.
23. N.Y. Sreedhar, K.R. Samatha, P.R.K. Reddy, S.J. Reddy. *Int. J. Environ. An. Ch.* 72 (4) (1998) 247.
24. H. Prosen, L. Zupancic-Kralj, J. Marsel. *J Chromatogr. A* 704 (1995) 121.
25. G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim. *J Chromatogr. A* 869 (1-2) (2000) 463.
26. E. Primo Yúfera, J.M. Carrasco Dorrien. "Química Agrícola II: Plaguicidas y Fitorreguladores". Editorial Alhambra. 1977.
27. B. Godskesen, P.E. Holm, O.S. Jacobsen, C.S. Jacobsen. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (3) (2005) 510.
28. M.C. Díaz Alvarez, S. Garrido Valero, R. Hidalgo González. "Contaminación agraria difusa". Dirección General de Medio Ambiente. Ministerio de Obras Públicas. Madrid. 1989.
29. S. Navarro, J. Oliva, A. Barba, C. Garcia. *J. AOAC Int.* 83 (5) (2000) 1239.
30. C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, E. Miguel, J.L. Tadeo. *J. Chromatogr. A* 823 (1-2) (1998) 17.
31. C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C Pérez-Conde, C. Cámara. "Use of molecular imprinted polymers (MIP) for triazine determination in vegetable samples". International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field. Coruña. 2003.
32. J.L. Tadeo, C. Sanchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, J. Chromatogr. A 882 (2000) 175.
33. Smith A.E. *Int. J. Environ. An. Ch.* 59 (1995) 97.
34. G.C. Galletti, A. Bonetti, G. Dinelli. *J. Chromatogr. A* 692 (1995) 27.
35. C.R. Powley, P.A. de Bernard. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 514.
36. A.K. Sarmah, R.S. Kookana. *J. Environ. Sci. Health B* 34 (1999) 363.
37. D. Volmer, J.G. Wilkes, K. Levsen. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 767.
38. L.J. Marek, W.C. Koskinen. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3878.
39. M. Rodriguez, D.B. Orescan. *Anal. Chem.* 70 (1998) 2710.
40. R. Bossi, B. Koppen, N.H. Spliid, J.C. Streiberg. *J. AOAC Int.* 81 (1998) 775.
41. H. Berrada, G. Font, J.C. Moltó. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (1) (2003) 19.
42. E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, M.R. Gates, P.M. Werner, S.L. Battaglin. *Sci. Total Environ.* 248 (2-3) (2000) 135.
43. I. Ahmad, G. Crawford. *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 138.
44. P. Klaffenbach, P.T. Holland. *Biol. Mass Spectrom.* 22 (1993) 565.
45. E. G. Cotterill. *Pestic. Sci.* 34 (1992) 291.
46. G. Dinelli, A. Vicari, V. Brandolini. *J. Chromatogr. A* 700 (1995) 201.
47. Z.L. Chen, R.S. Kookana, R. Naidu. *Chromatographia* 52 (3-4) (2000) 142.

48. D. G. Thompson, L.M. MacDonald. *J. AOAC Int.* 75 (1992) 1084.
49. H.J. Menne, K. Janowitz, B.M. Berger. *J. AOAC Int.* 82(6) (1999) 1534.
50. J. Tekel, J. Kovacicová. *J. Chromatogr. A* 643 (1993) 291.
51. H.J. Stan, P. Klaffenbach. *Fresen. J. Anal. Chem.* 339 (1991) 40.
52. H.J. Stan, P. Klaffenbach. *Fresen. J. Anal. Chem.* 339 (1991) 151.
53. C. Mouvet, J. Lantos, U.A. Th. Brinkman, R.W. Frei. *J. Chromatogr. A* 292 (1984) 117.
54. "Analytical Methods for Pesticide Residue in Foodstuffs". 6th Ed. General Inspectorate for Health Protection, Ministry of Health, Welfare and Sport. The Hague. The Netherlands. 1996.
55. S.R. Ruberu, W.M. Draper, S.K. Perera. *J. Agric. Food Chem.* 48 (9) (2000) 4109.
56. M.C. Gennaro. *J Chromatogr. A* 910 (1) (2001) 79.
57. S. Broussard, H. Riolland, N. Baran, R. Abuknesha, G. Ismail. *Chemosphere* 35 (5) (1997) 1099.
58. M.J.G. de la Huebra, P. Hernandez, Y. Ballesteros, L. Hernandez. *Talanta.* 54 (6) (2001) 1077.
59. B. Berger. *J. Chromatogr. A* 769(2) (1997) 338.
60. M.J.M. Wells, L.Z. Yu. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 237.
61. M.J. Santos-Delgado, E. Crespo-Corral, L.M. Polo-Díez. *Talanta.* 53 (2000) 367.
62. W.L. Budde. *Mass Spectrom Rev.* 23 (1) (2004) 1.
63. S. Marchese. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 393.
64. J.W. Dolan. *LC-GC N. Am.* 19 (11) (2001).
65. M.I. Catalina, J. Dalluge, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman. *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 153.
66. M. Rompa, E. Kremer, B. Zygmunt. *Anal. Lett.* 37 (2004) 3299.
67. A. Zapf, H.J. Stan. *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 83.
68. A. Scheyer. "Développement d'une méthode d'analyse par CPG/MS/MS de 27 pesticides identifiés dans les phases gazeuse, particulaire et liquide de l'atmosphère. Application à l'étude des variations spatio-temporelles des concentrations dans l'air et dans les eaux de pluie". Tesis doctoral. Universidad de Estrasburgo, Francia. 2004.
69. E. Macutkiewicz, M. Rompa, B. Zygmunt. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (2003) 1.
70. K. Yamauchi, T. Tanabe, M. Kinoshita. *J. Org. Chem.* 44 (1979) 638.
71. W. Butte. *J. Chromatogr.* 261 (1983) 142.
72. W.W. Christie. "Advances in Lipid Methodology". W.W. Christie (Ed.), Oily Press, Dundee. 1993.
73. J.M. Halket, V.G. Zaikin. *Eur. J. Mass Spectrom.* 10 (2004) 1.
74. D. C. Montgomery. "Diseño y Análisis de Experimentos". Ed. Iberoamericana. México D.F. 1991.

75. H.B. Wan, W.G. Lan, M.K. Wong, C.Y. Mok, Y.H. Poh. *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 255.
76. E. Barrado, F. Prieto, M. Vega, F. Fernández-Polanco. *Water Res.* 32 (1998) 3055.
77. Documento N° SANCO/10476/2003, de 5 de febrero de 2004, de la Comisión Europea. "Quality Control Procedures for Pesticide Residue analysis". Bruselas. 2004. Actualizado por medio del Documento N° SANCO/10232/2006, de 24 de Marzo de 2006. Última actualización: N° SANCO/2007/3131, de 31 de Octubre de 2007.
78. F. Anastassiades, K. Mastovska, S.J. Lehotay. *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 163.
79. F.J. Schenck, S.J. Lehotay. *J. Chromatogr. A.* 868 (1) (2000) 51.
80. L. Alder, A. Hill, P.T. Holland, J. Lantos, S. M. Lee, J. D. MacNeil, J. O'Rangers, P. van Zoonen, A. Ambrus. "Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentrations of Organic Chemicals". Annex 5: Definitions. AOAC-FAO-IAEA-IUPAC Validation Guide Residues.
81. D.R. Erney, T.M. Pawlowski. *J. High Res. Chromatogr.* 20 (7) (1997) 375.
82. J.L. Martínez Vidal, F.J. Arrebola, A. Garrido Frenich, F.J. Egea González, M. Mateu Sánchez, J. Martínez Fernández. "GC-MS/MS analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. Reference matrixes for calibration. Use of solvent calibration and correction functions". 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. Almería. 2003.
83. S.J. Lehotay, A. de Kok, W. Hiemstra, T. van Bodegraven. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 595.
84. ENAC. "Laboratorios de ensayo: acreditación de análisis de residuos de plaguicidas en productos alimenticios". NT-19 Rev. 2. 2006.
85. C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo. *Quim. Anal.* 15 (1996) 53.
86. K. Mastovska, S. Lehotay. *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 259.
87. E. Kremer, M. Rompa, B. Zygmunt. *Chromatographia* 60 (2004) 169.
88. J. Nolte, R. Kruger. *Fresen. J. Anal. Chem.* 365 (1999) 610.
89. M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood. *Pure Appl. Chem.* 74 (5) (2002) 835.
90. B. Albero, C. Sánchez-Brunete, A. Donoso, J.L. Tadeo. *J. Chromatogr. A* 1043 (2) (2004) 127.
91. V. A. Fassel. *Anal. Chem.* 48 (1976) 2294.
92. L.A. Currie. *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1699.
93. F. Pena, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcarcel. *Talanta*, 56 (4) (2002) 727.
94. H. Berrada, G. Font, J.C. Molto. *Chromatographia*. 54 (3-4) (2001) 253.
95. R. Carabias-Martínez, C. García-Hermida, E. Rodríguez-Gonzalo, F.E. Soriano-Bravo, J. Hernández-Méndez. *J. Chromatogr. A* 1002 (1-2) (2003) 1.
96. M. Godula, J. Hajslova, K. Alternova. *J. High Res. Chromatogr.* 22 (7) (1999) 395.
97. Document No. OPPTS 860.1340. US Environmental Protection Agency. Washington, DC. 1996.

98. "Pesticide Analytical Manual". Food and Drug Administration, USA. Vol. 1, 3rd Edition, 1994. Revisado 1999.
99. "Residue Chemistry, Test Guidelines", OPPTS 860.1340. Residue Analytical Method. 1996.

CAPÍTULO 3:

***OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN
MULTIRRESIDUO DE HERBICIDAS EN
MUESTRAS DE SUELO***

ÍNDICE

3.1. Introducción	93
3.1.1. Interacción Suelo:Herbicidas	93
3.1.1.1. Características de los Suelos	93
3.1.1.2. Características de los Herbicidas	95
3.1.2. Técnicas de Extracción de Residuos de Herbicidas en Suelo.....	96
3.1.3. Métodos de Extracción de Residuos de Herbicidas en Suelo	98
3.1.4. Limpieza de Muestras de Suelo	100
3.1.5. Objetivos.....	103
3.2. Material y Métodos	104
3.2.1. Reactivos	104
3.2.2. Analitos.....	104
3.2.3. Material de Laboratorio	105
3.2.4. Muestras de Suelo	105
3.2.5. Concentración del Extracto	106
3.2.6. Extracción.....	107
3.2.6.1. Experimentos Previos	107
3.2.6.2. Diseño Ortogonal.....	110
3.2.7. Limpieza de Muestra	110
3.2.7.1. Extracción en Fase Sólida (SPE).....	110
3.2.7.2. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (dSPE).....	111
3.2.8. Análisis	112
3.3. Resultados y Discusión	113
3.3.1. Concentración del Extracto	113
3.3.2. Extracción.....	114
3.3.2.1. Experimentos Previos	114
3.3.2.2. Diseño Ortogonal.....	119
3.3.3. Limpieza de Muestra	123
3.3.3.1. Extracción en Fase Sólida (SPE).....	123
3.3.3.2. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (dSPE).....	125
3.3.4. Validación de los métodos de análisis de residuos.....	128
3.3.4.1. Especificidad/Selectividad.....	129
3.3.4.2. Linealidad	129
3.3.4.3. Límites de Detección y Cuantificación	129
3.3.4.4. Efecto Matriz	132
3.3.4.5. Exactitud (Recuperación) y Precisión	132
3.3.4.6. Robustez	135
3.3.4.7. Incertidumbre	138
3.4. Conclusiones	140
3.5. Bibliografía	142

3.1. INTRODUCCIÓN

En condiciones reales de campo existe el peligro potencial de que los suelos agrícolas se contaminen con herbicidas, indirectamente a partir de las hojas de los cultivos, y directamente a partir de los tratamientos en el suelo [1]. Como ya se detalló en el Capítulo 1, la determinación de estos residuos de herbicidas en el suelo es muy importante ya que tienen efectos nocivos cuando no se degradan lo suficientemente rápido [2].

3.1.1. INTERACCIÓN SUELO:HERBICIDAS

Los factores que influyen en la distribución y en el comportamiento posterior de un herbicida como producto contaminante en el suelo son [3]:

1. Las propiedades del suelo.
2. Las propiedades físico-químico-biológicas del fitosanitario.
3. Las interacciones suelo-herbicida.

3.1.1.1. Características de los Suelos

La *Materia Orgánica* es una mezcla heterogénea de productos resultantes de la transformación química y biológica de residuos orgánicos, entre ellos, restos orgánicos frescos, productos excretados por los organismos, productos de descomposición y compuestos de síntesis [3]. Dentro de este grupo tenemos las sustancias no húmicas y el humus, formado por los ácidos fúlvicos y húmicos, y las huminas insolubles.

Los contenidos de materia orgánica en el suelo son muy variables, van desde el 0,5% al 10%. El contenido en materia orgánica en la parte superior de los suelos cultivados de la zona mediterránea suele variar entre el 1 y el 3% [4].

El humus presenta en su superficie grupos ácidos carboxílicos e hidroxílicos de naturaleza ácido débil que le confieren tal característica. Estos grupos proporcionan un considerable poder tampón al suelo. El valor aparente de la constante de acidez del humus es aproximadamente igual a 6, aumentando el número de cargas que presenta la micela de humus al aumentar el pH del medio. Las sustancias húmicas intervienen en las reacciones de intercambio catiónico (adsorción de cationes y fitosanitarios) presentando una elevada capacidad de intercambio catiónico dependiente del pH, debido a la disociación de los grupos funcionales de carácter ácido. La naturaleza aromática de la materia orgánica, es también importante en la formación de complejos de transferencia de carga. También es posible la formación de puentes de hidrógeno directamente entre soluto y adsorbente o indirectamente a través de la hidratación de moléculas de agua [3].

El término *Textura* se usa para representar la composición granulométrica del suelo. Cada termino textural corresponde con una determinada composición cuantitativa de arena (partículas entre 2 y 0,05 mm), limo (partículas entre 0,05 y 0,002 mm) y arcilla (partículas < 0,002 mm), según la clasificación del Departamento de Agricultura de EEUU (USDA). Los términos texturales se definen de una manera gráfica en un diagrama triangular que representa los valores de las tres fracciones.

Los suelos arenosos son muy inertes mientras que las arcillas tienen un alto poder de amortiguación, pueden fijar y transformar a los contaminantes y presentan, por tanto, una alta capacidad de autodepuración. Se caracterizan por tener una gran superficie específica y por estar cargadas, con lo que su interacción con las moléculas de herbicidas polares es potencialmente elevada. Los suelos francos son equilibrados con

propiedades compensadas. Los suelos coloidales, arcillosos o húmicos poseen un mayor poder de adsorción que los suelos arenosos [5].

La fase sólida del suelo es muy heterogénea. Existen asociaciones entre sustancias húmicas, arcillas, óxidos metálicos, carbonatos y otros minerales (en algunos casos más del 90% de la materia orgánica se encuentra asociada a la fracción mineral del suelo). En general, los suelos con alto contenido en arcilla y materia orgánica tienen una alta afinidad por los herbicidas, debido a que éstos sufren una gran adsorción a los coloides del suelo, con la consiguiente disminución de las pérdidas por lixiviación y volatilización.

Los principales *Intercambiadores de Iones* en el suelo son las arcillas y la materia orgánica. La capacidad de intercambio iónico consiste en procesos reversibles por los cuales las partículas sólidas del suelo adsorben iones de la fase acuosa liberando al mismo tiempo otros iones en cantidades equivalentes, estableciéndose el equilibrio entre ambas fases. Como los iones adsorbidos quedan en posición asimilable constituyen la reserva de nutrientes para las plantas. La superficie de las arcillas está cargada negativamente debido a las sustituciones isomórficas en las láminas de arcilla de iones de mayor carga positiva por iones de menor carga positiva, generalmente aluminio por silicio y aluminio por magnesio. Esta carga superficial está compensada por cationes intercambiables en la disolución del suelo próximos a la superficie de las arcillas. Los herbicidas pueden adsorberse a los minerales de la arcilla a través de los cationes de cambio (bien directamente o bien por medio de moléculas de agua coordinadas a ellos), por lo que muchas transformaciones abióticas dependen de la naturaleza de estos cationes de cambio. Muchos de los productos fitosanitarios utilizados se presentan en forma de cationes y la capacidad de intercambio catiónico es decisiva para determinar el grado de adsorción de este tipo de compuestos y por tanto el nivel de retención en el suelo.

Los suelos son una mezcla compleja de componentes sólidos que reaccionan simultáneamente para dar un determinado valor de *pH*. Estos componentes tamponan el suelo contra cambios producidos por la adición natural o antropogénica de ácidos y bases [6].

La degradación y movilidad de los fitosanitarios en el suelo dependen del pH del suelo, ya que éste determina la carga superficial de los componentes con carga variable del suelo y, por tanto, afecta al grado de ionización de los compuestos orgánicos ácidos o básicos, determinando la proporción de herbicida que se encuentra en forma ionizada o molecular, lo que afecta a la cantidad de enlaces existentes entre el suelo y el herbicida [7]. El pH de la disolución del suelo puede influir directa o indirectamente en los mecanismos de adsorción del suelo. Un cambio de pH puede alterar la carga neta de los herbicidas ionizables o de los componentes del suelo, modificando directamente sus interacciones [8].

La importancia del contenido en *Humedad* del suelo en la adsorción del herbicida puede ser explicada por dos mecanismos. Uno se relaciona con la solubilidad del herbicida, ya que ésta varía con el contenido de agua [9]. Cuando este contenido es bajo, debido a la baja solubilidad que generalmente presentan la mayor parte de los herbicidas, tienden a quedar en estado sólido y, por tanto, difícil de adsorberse. Un segundo mecanismo tiene que ver con la competencia del herbicida por los lugares de adsorción a diferentes niveles de humedad. El agua está adsorbida muy fuertemente en los lugares de adsorción del coloide por ser un compuesto muy polar. Por ello los

contenidos bajos en humedad provocan una fuerte retención del agua, que deja pocos sitios activos libres para que el herbicida pueda adsorberse [10].

La retención de los compuestos orgánicos por los constituyentes minerales y orgánicos depende de la humedad del suelo [11]. En suelos secos, la adsorción de compuestos orgánicos resulta fundamentalmente de las interacciones del herbicida con los componentes minerales, mientras que en suelos húmedos, es la materia orgánica la que tienen un papel más importante. Esto es debido a la fuerte interacción de dipolo entre la fracción mineral del suelo y las moléculas de agua, la cual excluye a los compuestos orgánicos, especialmente los poco solubles en agua de esta fracción del suelo. Así la solubilidad del herbicida en el agua sería uno de los principales factores que afectan al fenómeno de adsorción.

Los procesos de adsorción son exotérmicos, mientras que los de desorción son endotérmicos, por lo que un incremento de **Temperatura** dará lugar a una disminución de la adsorción y un aumento de la desorción [12]. Por otra parte, la temperatura afecta a la solubilidad de los herbicidas, y por tanto, también indirectamente a la adsorción. El efecto de la temperatura en la adsorción depende de la fuerza de la interacción entre el soluto y la superficie, a mayor fuerza de interacción, mayor es la influencia de la temperatura [13].

3.1.1.2. Características de los Herbicidas

Las propiedades fundamentales de los herbicidas que van a influir en su comportamiento en el suelo son la presión de vapor, la solubilidad, la hidrofobicidad (coeficiente de partición octanol/agua), el peso molecular, y la constante de acidez [14], que se presentaron para los herbicidas de estudio en la Tabla 2.1.

Los herbicidas se van a unir al suelo en función de cómo sea su **Coefficiente de Reparto n-octanol/agua**. Herbicidas con coeficientes de reparto muy grandes van a sufrir una unión muy fuerte al suelo. La mayoría de los herbicidas poseen coeficientes de reparto en torno a 5, que es el balance perfecto para poder penetrar lo suficiente en el suelo como para ser absorbido por las raíces de las malas hierbas, mientras que no llega tan profundo como para serlo por las raíces del cultivo que interesa proteger o pasar a las reservas de acuíferos. Dentro de este grupo se encuentran las Ureas, Triazinas, Acetanilidas, etc. No obstante, hay otros herbicidas con coeficientes de reparto menores o iguales a 1, como el Dicamba, que se disuelven en el agua y pueden encontrarse en zonas muy profundas.

La **Volatilización** se produce en las capas más superficiales del suelo. El grado de volatilización viene dado por su presión de vapor. Aumenta con la temperatura, no obstante con la temperatura también se produce un aumento de pérdida de agua del suelo, pudiendo dejar ésta más centros activos de adsorción libres y disminuir este proceso. En un suelo húmedo las pérdidas por volatilización son mayores debido a la competencia de las moléculas de agua con las de herbicida por los lugares de adsorción de los coloides.

Los **Herbicidas Ácidos o Básicos** son aquellos capaces de formar iones en el rango de pH de los sistemas de suelo-agua en el medio ambiente, es decir, entre valores de 5 a 8. Su comportamiento cambia totalmente en función de si se produce esta ionización o no. Casi la tercera parte de las materias activas que se utilizan actualmente son capaces de ionizarse, limitando las generalizaciones que se hacen normalmente para compuestos neutros. La mayoría de los herbicidas ácidos se encuentra predominantemente en forma

iónica al pH de la mayor parte de suelos agrícolas, mientras que los herbicidas básicos están en forma molecular.

Para *herbicidas de carácter ácido débil*, el pH del medio es fundamental para determinar en que forma se encuentran en el suelo [15]. Así, si el pH del medio es menor que su constante de acidez, predominará la forma molecular y por tanto tendrá más afinidad hacia la materia orgánica [3]. En cambio, si el pH del medio supera la constante ácida, predominará la forma iónica del herbicida y se adsorberá de forma sólo moderada en la materia orgánica, siendo repelido por las arcillas [7]. Como los herbicidas ácidos están ionizados en la mayoría de suelos agrícolas, los contenidos altos en materia orgánica disminuirán la unión de los herbicidas a la matriz del suelo y aumentarán la recuperación en la extracción. Se asume, por tanto, que la materia orgánica y la arcilla tienen efectos positivos en la recuperación de herbicidas aniónicos [16].

Los Fenoxiácidos se adsorben más a valores de pH del suelo bajos (menores que 4), ya que al pH medioambiental (5-8) están ionizados, y por tanto, no adsorbidos [17], al igual que las Sulfonilureas. Debido a su baja adsorción al suelo y su alta solubilidad en agua en suelos neutros o alcalinos, existe el peligro de que se lixivien en condiciones de campo tras fuertes lluvias [18]. Si el pH aumenta, las Sulfonilureas cargadas se liberan estando disponibles para las plantas [19].

En cuanto a los herbicidas *bases débiles*, como las Triazinas, cuando los suelos son neutros o básicos, se adsorben preferentemente a la materia orgánica, mientras que en suelos ácidos adquieren cargas positivas lo que hace que se retengan por la atracción con las cargas negativas de las arcillas [20,21]. Si el pH aumenta, las Triazinas no están protonadas y otros mecanismos como los puentes de hidrógeno y otras interacciones débiles se vuelven más importantes [7,22]. El mecanismo de adsorción cambia entonces de naturaleza, pasando de ser una adsorción química sobre la superficie de los coloides arcillosos a una adsorción física, en la que compiten fenómenos de intercambio iónico y de exclusión aniónica.

Los herbicidas no iónicos, compuestos sin carga, están principalmente retenidos por la materia orgánica del suelo [13]. Están muy poco adsorbidos en las arcillas a partir de la disolución del suelo, y compiten con el agua por los lugares de adsorción.

3.1.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE RESIDUOS DE HERBICIDAS EN SUELO

La extracción de residuos en muestras de suelo es mucho más difícil que su extracción en otras matrices medioambientales como agua o aire, y normalmente necesita más pasos en la extracción, ya que el suelo es una matriz muy compleja. Los residuos de herbicidas en el suelo pueden estar enlazados, lo que afectará a la eficiencia de la extracción.

En los métodos multiresiduo, la extracción de un gran número de analitos de polaridades diferentes implica disminuir la sensibilidad, usar grandes volúmenes de disolventes orgánicos, extracciones largas, y varias limpiezas del extracto. Actualmente las técnicas modernas, con el gran número de disolventes y adsorbentes que existen en combinación con la temperatura y la presión, permiten obtener la sensibilidad necesaria en un único paso.

La **Agitación Mecánica** consiste en la agitación del suelo con un disolvente adecuado, y posterior separación por centrifugación, decantación o filtración. Puede usarse para muestras entre 10 y 100 g. Normalmente se utilizan disolventes orgánicos de diferentes polaridades pero también se ha propuesto el **Agua Subcrítica**, como un disolvente adecuado que puede extraer cuantitativamente analitos polares y apolares del suelo [23].

La extracción con **Soxhlet** se usa para extraer analitos polares fuertemente unidos al suelo ya que utiliza extracciones continuas que aumentan su eficacia. Suelen usarse mezclas que contengan un disolvente miscible con el agua y otro apolar. Se extraen entre 10-30 g de suelo, que se secan con sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4), y se llevan de 8 a 16 h a reflujo para extraer los residuos.

La extracción por **Ultrasonidos** se usa para analitos apolares. Las vibraciones rompen la matriz del suelo ayudando a liberar los herbicidas. Utiliza entre 10-30 g de suelo, que se secan con Na_2SO_4 , y se extraen con un disolvente durante 10-20 min por ultrasonidos.

Alternativamente también se han utilizado la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción acelerada con disolventes (ASE), o la extracción con disolventes asistida por microondas (MASE) que proporciona recuperaciones análogas a otros métodos pero mejores reproducibilidades.

SFE se usa para compuestos apolares. Utiliza pequeñas cantidades de suelo (0,5-10 g). El extractante que se usa es CO_2 supercrítico, que tiene propiedades de líquido y gas. El fluido supercrítico puede penetrar fácilmente en los poros pequeños del suelo y disolver mejor los herbicidas apolares. La adición de un modificador polar, como el metanol, mejora las recuperaciones de los compuestos polares [24]. Se ha utilizado para extraer las dinitroanilinas, con resultados comparables con el Soxhlet y la agitación en términos de sencillez, eficiencia, selectividad y reproducibilidad [25].

ASE es un proceso automático desarrollado por *Dionex* que se utiliza para herbicidas de diferentes polaridades. Se extraen pequeñas cantidades de suelo (0,5-20 g) a altas temperaturas y presiones. La temperatura elevada acelera la cinética de la extracción mientras que la presión mantiene el disolvente por debajo de su punto de ebullición. Reduce mucho el tiempo de extracción y el volumen de disolvente usado comparado con la agitación. Se ha utilizado, entre otros, para la extracción de Triazinas y Fenilureas con 30 ml de acetona en 15 g de suelo a 100 atm y 50°C [26].

La extracción por **Microondas** es una técnica relativamente nueva que se usa para analitos apolares, volátiles o semivolátiles. Se usan pequeñas cantidades de suelo (0,5-20 g) que se extraen con disolventes orgánicos ayudados con la energía de microondas a temperaturas (100-115°C) y presiones elevadas (50-175 psi). Necesita menos tiempo y disolvente que el Soxhlet pero está limitado a compuestos térmicamente estables [27].

La tendencia general, es hacia una mayor automatización, ya que la mayoría de los métodos actuales siguen siendo muy laboriosos, y hacia una miniaturización para evitar el uso excesivo de reactivos tóxicos. Entre estas técnicas destacan la *stir-bar sorptive extraction*, extracción con agitadores magnéticos adsorbentes (**SBSE**), en las que la muestra se extrae mediante agitación con un agitador magnético recubierto de un adsorbente, posteriormente desorbido en el inyector del sistema cromatográfico, y la microextracción en fase sólida (**SPME**), en la cual los analitos se adsorben en una fibra puesta en contacto con la muestra que también se desorbe directamente en el inyector del sistema cromatográfico [28,29].

3.1.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE RESIDUOS DE HERBICIDAS EN SUELO

Uno de los principales problemas en la determinación de residuos en muestras de suelos es la falta de métodos estándar de laboratorio. Es difícil llegar a un consenso puesto que la extracción debe adaptarse y optimizarse en función de la naturaleza de los suelos, los herbicidas y sus metabolitos [30].

Antes de la década de los 60, se utilizaban procedimientos analíticos individuales para cada herbicida pero, debido a que el número de herbicidas fue creciendo, esta metodología no era práctica, lo que condujo al desarrollo de métodos multiresiduo para el análisis de muestras medioambientales. Además, normalmente el historial de tratamientos o medioambiental de la mayoría de muestras es desconocido, por lo que interesa analizar el mayor número posible de analitos, incluso aunque las recuperaciones sean peores respecto de los métodos unirresiduo [31,32].

El Documento N° *SANCO/825/00* de la EU [32] propone los siguientes métodos multiresiduo para plaguicidas en suelo (Figura 3.1):

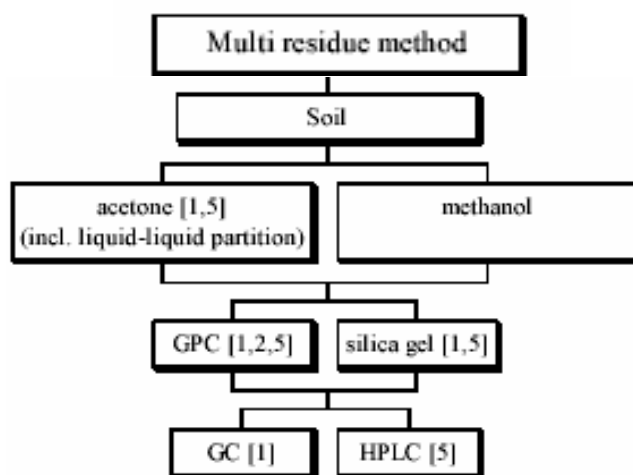


Figura 3.1. Métodos multiresiduo para plaguicidas en suelos propuestos por el Documento N° *SANCO/825/00* de la EU [32].

Los métodos que usan acetona, lo hacen en una extracción polar en combinación con agua (2:1, v/v), seguido de un reparto de las moléculas de interés en un disolvente orgánico inmiscible con el agua, diclorometano o éter de petróleo u otro disolvente adecuado, y cloruro sódico, NaCl (método estándar alemán DIN EN 11264) [33(1),34(2)]. Estos disolventes junto con la acetona de la primera fase de la extracción forman la fase orgánica, mientras que los compuestos hidrofílicos de la matriz quedan retenidos en la fase acuosa saturada con NaCl. Estos métodos se han mejorado con la sustitución del diclorometano por acetato de etilo-ciclohexano como fase orgánica en el reparto [35(3)]. Si es necesario puede realizarse una limpieza posterior con Cromatografía por Permeación en Gel (GPC) o el fraccionamiento por adsorción en una columna cromatográfica de sílica gel desactivada con 1,5% de agua, y finalmente el análisis por GC.

En principio son métodos que se usan para determinar un gran número de plaguicidas directamente analizables por GC, pero también pueden aplicarse a analitos ácidos si se

acidifican los extractos antes del reparto, y se derivatizan previamente al análisis. Consiguen LD de hasta 10 µg/kg.

También la **EPA** ha desarrollado varios métodos para el análisis de residuos de herbicidas en muestras sólidas, entre ellas suelos [36]. El Método 8085 recomienda el uso de acetona:hexano (1:1) o acetona:diclorometano (1:1), en combinación con el Método 3540 (Soxhlet), el Método 3541 (Soxhlet automatizado), el Método 3545 (PFE), el Método 3546 (MASE), o el Método 3550 (extracción con ultrasonidos). En algunos casos el sobrenadante obtenido se filtra en una cama de Na₂SO₄ [37].

Las muestras de suelo son generalmente extraídas con uno o más **Disolventes Orgánicos**. Se ha utilizado una amplia variedad de disolventes, escogidos en función de la polaridad de los analitos a determinar, normalmente acetona, metanol, acetonitrilo o acetato de etilo [7]. En muchas ocasiones, se ha encontrado que la **Adición de Agua** aumenta la desorción de los herbicidas desde la matriz porque actúa como disolvente para el analito y como soluto que compite por los sitios de adsorción [38]. También se utilizan **Modificadores** como ácidos, bases, soluciones salinas o quelatantes para favorecer la extracción desde el suelo dependiendo del tipo de unión química del analito a éste [7].

La extracción de **Herbicidas Neutros** (dinitroanilinas, tiocarbamatos, fenilureas) de los suelos se lleva a cabo normalmente con disolventes orgánicos polares o apolares [38]. Entre ellos los más usados son, la acetona, el acetato de etilo, el acetonitrilo y el diclorometano, y la extracción se produce por agitación, ultrasonidos o Soxhlet.

Un método multirresiduo para extraer una amplia variedad de residuos neutros de herbicidas propone la extracción con una mezcla de acetonitrilo y agua, y posterior reparto de las muestras en éter de petróleo:éter dietílico antes de su análisis por GC-MS [39].

Los **Herbicidas Básicos** como las Triazinas se extraen del suelo con disolventes orgánicos de polaridad media o alta, como el acetonitrilo [40] por agitación o Soxhlet. También se ha utilizado la SFE, los ultrasonidos con agua y metanol [41], las microondas [40], la extracción con agua asistida por microondas [42], la extracción con agua subcrítica [43], SPME [44], y combinaciones de varias técnicas como MAE-SPME [45].

En algunos casos se ha utilizado el amoníaco como modificador, proporcionando un medio básico que aumenta las recuperaciones en mezclas acuosas con acetonitrilo a pH 9 por agitación. El agua se separa por reparto con diclorometano que se lleva posteriormente a sequedad [46].

La extracción de los **Herbicidas Ácidos** (fenoxiácidos, ácidos benzoicos, sulfonilureas) del suelo siempre es un reto [47]. Se lleva a cabo normalmente por medio de extracciones sólidas o líquidas por agitación o Soxhlet [48] con mezclas de disolventes orgánicos como acetona, éter dietílico, diclorometano, acetonitrilo o mezclas de estos disolventes [16], con agua a pH ácido [49-51], o con disoluciones alcalinas mediante agitación. Posteriormente se acidifica, se separa del agua mediante un disolvente orgánico inmiscible con ella, o con SPE [52-57]. Este último método también se ha usado para los fenoles [33].

El método EPA 8151A [58] propone ajustar el pH a 2 y extraer con acetona y diclorometano por ultrasonidos o con acetona y éter dietílico por agitación. El método 8321A [59] propone la determinación de los Fenoxiácidos y sus ésteres sin hidrólisis con agua ajustada a pH 2, acetona y éter dietílico.

Muchos procedimientos han demostrado el uso satisfactorio de las mezclas de disolventes orgánicos, principalmente acetonitrilo, con agua y ácido acético para la extracción de herbicidas ácidos [18,52,43,60,61] incluyendo también herbicidas neutros [61] y siendo más eficaz que la extracción alcalina [16]. El agua posteriormente se separa por reparto con diclorometano.

También se han extraído por esterificación “in situ” a sus ésteres metílicos [62]. Otra técnica usada ha sido la SFE [63], pudiendo acoplarse la derivatización [47], pero se considera muy cara debido al coste instrumental y el tiempo que necesita por muestra. Últimamente se ha utilizado MASE [64], técnica muy atractiva debido a que necesita poco tiempo de extracción y tiene alta eficiencia [65].

La mayoría de los métodos propuestos para analitos ácidos tienen una debilidad al no incluir el análisis de aquellos herbicidas que se usan en combinación con ellos, principalmente sus ésteres, lo que implica tener que llevar a cabo varios métodos de extracción [43]. A veces se especifica una hidrólisis en medio básico [58] para liberar los ésteres a sus ácidos antes de la extracción. A pesar de que en el medio ambiente los ésteres se hidrolizan rápidamente [28,66,67,68], se considera preferible extraer ambas formas simultáneamente, ya que la hidrólisis podría provocar la pérdida de otros analitos y no sería posible un método multiresiduo [69].

En la bibliografía se encuentran muchos métodos para las familias de las Ureas [70]. Se extraen del suelo por agitación con disolventes orgánicos de polaridad media o alta como la acetona o el metanol, seguido de un reparto o limpieza con cartuchos [18,38]. También se han utilizado disoluciones de carbonato amónico con un 10% de metanol para extraer residuos envejecidos de Sulfonilureas del suelo [71,72]. Algunas tienen tendencia a unirse a las arcillas del suelo y el contraíón que proporciona el carbonato amónico se necesita para liberar los residuos. La pequeña cantidad de disolvente orgánico es necesaria para liberar las Sulfonilureas más hidrofóbicas de aquellos suelos que contienen mucha materia orgánica. El extracto se concentra y se purifica mediante cartuchos para eliminar los co-extractos de la matriz.

Algunas, como el Tribenuron metil son poco estables en disolución, incluso en disolventes orgánicos polares, por lo que el problema de la extracción radica en que se necesitan procedimientos lo suficientemente rápidos para evitar el proceso de la degradación [73]. A pH menores que 5, el Tribenuron metil se degrada con rapidez, siendo el tiempo de vida media aproximado de 2 horas, ya que se rompe su enlace de sulfonilurea. La máxima estabilidad se logra con un pH comprendido entre 6 y 9 [74].

Como conclusión, se deduce que existen varios métodos multiresiduo para herbicidas en suelos pero la mayoría sólo extraen aquellos analitos que pertenecen a la misma familia [75,76].

3.1.4. LIMPIEZA DE MUESTRAS DE SUELO

Muchos métodos de extracción de residuos de herbicidas en muestras de suelo proponen un paso de limpieza del extracto antes de su análisis. Esto es debido a la presencia de sustancias interferentes que dificultan la identificación de los analitos de interés, pudiendo incrementar la respuesta mediante el efecto matriz en el sistema cromatográfico al depositarse sobre él, disminuyendo su capacidad analítica y aumentando el mantenimiento necesario.

El mayor interferente en las muestras de suelo son los ácidos húmicos que forman parte de la materia orgánica. Son sustancias no volátiles, de alto peso molecular que se

adhieren a las partes del sistema de inyección y de la columna cromatográfica, interaccionando con los analitos y produciendo pérdidas de resolución y de simetría de los picos.

Los métodos de análisis recomendados suelen incluir pasos de limpieza, como GPC o el fraccionamiento por adsorción en sílica gel desactivada, en los métodos recomendados por el Documento N° SANCO/825/00 de la EU [32], o el uso de Florisil o GPC en el caso de los métodos EPA [77].

El **Reparto Líquido-Líquido (LLP)** proporciona un método conveniente para separar agroquímicos de extractos altamente acuosos. El disolvente de reparto suele ser volátil e inmisible con el agua. La técnica se basa en que cuando una sustancia es miscible en dos líquidos inmiscibles, puede transferirse de un líquido a otro mediante agitación. El grado de reparto dependerá del coeficiente de distribución del agroquímico entre los dos líquidos inmiscibles. Es muy útil para los analitos ionizables, ya que puede ajustarse para maximizar el reparto en la fase orgánica o acuosa, según se desee. Entre sus inconvenientes está el uso de grandes volúmenes de disolventes, algunos peligrosos, la dificultad de automatización, la formación de emulsiones difíciles de romper o la pérdida de algunos analitos en el proceso.

La **Extracción en Fase Sólida (SPE)** se considera una técnica cromatográfica, ya que se basa en el mismo principio de separación que LC. Se introdujo en los años 70 como alternativa al reparto. Combina la extracción y la preconcentración de compuestos orgánicos mediante la adsorción en un material adecuado seguido de la elución con un volumen muy pequeño de disolvente orgánico. La interacción del analito entre el adsorbente y la fase móvil se optimizan para favorecer la retención o la elución. En comparación con el reparto, usa mucho menos volumen de disolventes orgánicos, es selectiva, y el extracto eluido final tiene menos interferencias.

Tabla 3.1. Adsorbentes y Disolventes usados en SPE en función de la polaridad.

Solubility of the sample	Water-soluble					Water-insoluble		
	Nonionic Aqueous			Ionic Aqueous		Aqueous	Organic	Organic
Solvent	Nonpolar	Middle polar	Polar	Cationic	Anionic	Nonpolar	Middle polar	Polar
Recommendable adsorption phase	C ₁₈ ec C ₁₈ C ₈ C ₄ C ₂ Phenyl CN	SiOH NH ₂	CN OH PA DMA NH ₂	SA	SB NH ₂ DMA	C ₁₈ ec C ₁₈ C ₈ C ₄ C ₂ Phenyl CN	SiOH NH ₂	CN OH PA DMA NH ₂
Selection of recommendable elution solvents	Hexane CH ₂ Cl ₂ Acetonitrile Alcohols	CHCl ₃ CH ₂ Cl ₂ Ethyl acetate Alcohols Water	CHCl ₃ CH ₂ Cl ₂ Ethyl acetate Alcohols Water	Acids Salt solutions Buffers	Bases Salt solutions Buffers	Hexane CH ₂ Cl ₂ Acetonitrile Alcohols	CHCl ₃ CH ₂ Cl ₂ Ethyl acetate Alcohols	CHCl ₃ CH ₂ Cl ₂ Ethyl acetate Alcohols

El relleno activo de la columna puede ser muy diverso según el tipo de muestra que se trate (Tabla 3.1.).

Entre los adsorbentes polares se encuentran la sílica, el Florisil o la alúmina. Retienen los compuestos con grupos polares en soluciones apolares. No son apropiados para los herbicidas muy polares, por lo que no suele usarse en métodos multiresiduo.

De la misma manera, un disolvente apolar puede usarse para eluir un analito apolar, dejando las interferencias polares retenidas en el adsorbente. La técnica más utilizada es la fase reversa. La fase estacionaria está formada por sílica derivatizada con cadenas largas de hidrocarburos (la más usada es C18). La fase móvil es polar (muestras de agua o tampones). C18 presenta buenas recuperaciones para la mayoría de los analitos básicos y neutros y los herbicidas ácidos/fenólicos, que para su retención necesitan acidificar la muestra previamente para suprimir la ionización de los herbicidas y favorecer su retención en el adsorbente. No es apropiado para los herbicidas polares o muy apolares. En este caso los adsorbentes poliméricos o GCB son una buena alternativa.

Los poliméricos están formados por un polímero de poliestireno-divinilbenceno altamente entrelazado. Presenta la ventaja de poder usarse con valores de pH más extremos que los de fase reversa, además de que su acondicionamiento no es tan crítico.

También existen adsorbentes de intercambio iónico para compuestos iónicos. El pH del extracto se ajusta para ionizar el analito de tal manera que quede retenido. Es una limpieza muy selectiva y se usa para separar los compuestos iónicos que no se extraen bien con reparto.

Existen nuevos adsorbentes que se basan en la interacción antígeno-anticuerpo, llamados inmunoabsorbentes. Debido a su alta afinidad y selectividad, se puede lograr la limpieza de matrices medioambientales muy complejas. Otros son los polímeros de impronta molecular (MIP), adsorbentes de reconocimiento molecular basados en polímeros altamente reticulados, preparados para unir compuestos estructuralmente relacionados con elevada selectividad.

Una alternativa a la SPE es la **SPE dispersiva** (dSPE) en la cual se utiliza el material adsorbente en polvo que se encuentra empaquetado en los cartuchos convencionales de SPE. Al extracto se le añade el adsorbente suelto, se agita, se centrifuga y se recupera el extracto limpio. Es muy ventajoso porque elimina todas las partes de acondicionamiento, paso de muestra y elución de los cartuchos tradicionales.

Por último, la **GPC** es una de las técnicas más universales para la eliminación de moléculas de elevado peso molecular, principalmente lípidos, pero no ofrece selectividad frente a interferencias de bajo peso molecular. Separa las moléculas pequeñas, como los herbicidas, ya que entran en los poros de un gel, formado por poliestireno-divinilbenceno, normalmente *Bio-Beads SX-3*, mientras que las moléculas grandes no pueden penetrar y pasan con el flujo de la fase móvil. Es una técnica de separación muy ventajosa para un gran número de matrices, ya que no existen pérdidas de analitos por adsorción, además de estar automatizada. Uno de sus inconvenientes es que usa grandes volúmenes de disolvente que hay que eliminar por evaporación.

La limpieza de la muestra suele limitar los métodos multiresiduo de plaguicidas porque consume demasiado tiempo y restringe el número de analitos a determinar [78], por lo que se aprecia una tendencia general hacia el uso de métodos más universales y poco exhaustivos sin incluir pasos de limpieza y, en su lugar, mejorar la especificidad de los detectores. De hecho, la disponibilidad actual de instrumentación sofisticada como GC-

MS/MS y LC-MS/MS permite prestar poca atención a los procesos de limpieza del extracto, debido a la gran sensibilidad y selectividad de la detección [79]. Los efectos cromatográficos de los extractos se compensan mediante el uso de patrones internos o calibrados en matriz. Un equipo de análisis que se use con estos extractos requerirá un mantenimiento constante pero el resultado global suele compensar.

3.1.5. OBJETIVOS

- Desarrollar un método multirresiduo para herbicidas de diferentes características en muestras de suelo, debido a la falta de métodos estándar de laboratorio para este tipo de muestras, y a que la mayoría de los métodos multirresiduo referenciados en suelos están diseñados para analitos de la misma familia.
- Seleccionar variantes de algunos de estos métodos de extracción y estudiar su influencia en la recuperación mediante un conjunto de experimentos previos a través de un Análisis de Componentes Principales (ACP). Posteriormente, optimizar mediante un Diseño Ortogonal, las variables que más influyen en la extracción para desarrollar un método único de extracción.
- Evaluar las condiciones en que se concentran los extractos, paso necesario para alcanzar una adecuada sensibilidad, y la utilidad de incluir pasos de limpieza de los extractos por SPE y dSPE, utilizando distintos adsorbentes.
- Validar el procedimiento optimizado, lo que incluye el estudio de la linealidad, los límites de detección y cuantificación, la evaluación del efecto matriz, los estudios de recuperación, precisión, robustez, y el cálculo de la incertidumbre.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. REACTIVOS

Los disolventes orgánicos usados para las extracciones fueron de calidad cromatográfica, suministrados por Labscan junto con el ácido acético glacial y el amoníaco (al 28% en agua). El etilenglicol fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

El agua utilizada fue suministrada por el sistema Milli-Q Plus de Millipore (Billerica, MA), que aseguraba el 99,99% de pureza mínima. Dicho agua tenía un pH de 6,5 y una conductividad de 18,2 mS/cm.

Se calentaron grandes cantidades de Na₂SO₄ anhidro, proporcionadas por Merck, a 500°C durante 5 horas previamente a su uso, para eliminar cualquier residuo de agua y ftalatos que pudieran contener.

Los cartuchos C18ne (200 mg, 10 ml), Florisil (200mg, 10 ml) y Nexus (60 mg, 10 ml), así como los adsorbentes PSA y GCB en polvo (40 µm de tamaño de partícula), eran de Varian (Harbor City, CA) y fueron suministrados por Scharlab. Los cartuchos Oasis HLB (200 mg, 6 ml) eran de Waters y los Strata X (200 mg, 6 ml), de Phenomenex (Torrance, CA).

3.2.2. ANALITOS

En este capítulo los herbicidas se agrupan en función de sus propiedades ácido-base, que son las que más afectan a la extracción (Tabla 3.2). Esto hace que los grupos varíen respecto de los definidos para el análisis en el Capítulo 2. Las sulfonilureas se incluyen en el grupo de los Ácidos, las fenilureas en el grupo de los Neutros, y la triazinas constituyen el grupo de los Básicos.

Tabla 3.2. División de los herbicidas para la optimización de la extracción en muestras de suelo.

Nº	Tipo	Compuesto	pKa (25°C)	Nº	Tipo	Compuesto
1		Dicamba	1,87	18		Metoxuron
2		2,4-D	2,87	19		Isoproturon
3		MCP	3,11	20		Clortoluron
4		Diclorprop p	3,67	21		Metabenzotiazuron
5		MCPA	3,73	22		Linuron
6	Ácidos	Amidosulfuron	3,58	23		Tralkoxidim
7		Tribenuron metil	4,70	24		Flamprop isopropil
8		Fenoxaprop p	4,60	25		Mefenpir dietil
9		Diclofop	3,60	26		MCPA tioetil
10		Flamprop	3,70	27	Neutros	Bifenox
11		Bromoxinil	3,86	28		Fenoxaprop p etil
12	Ioxinil	4,10	29	Diclofop metil		
13	Básicos	Cianazina	0,63	30		Prosulfocarb
14		Terbutilazina	2,00	31		Trialato
15		Terbutrina	4,30	32		Diflufenican
16		Metribuzina		33		Pendimetalina
17		Carfentrazona etil		34	Trifluralina	
				35	MCP isoocílico	
				36	Bromoxinil octanoato	
				37	Ioxinil octanoato	

La preparación de las disoluciones patrón de los analitos se detalló en el Apartado 2.2.2.

3.2.3. MATERIAL DE LABORATORIO

- Matraces aforados de vidrio (clase A) de varios volúmenes.
- Botes de vidrio topacio de 60 ml con tapón de rosca sin septum.
- Balanza de resolución 0,01 g de Methler.
- Balanza de resolución 0,0001 g de Methler.
- pHmetro modelo GLP-21 de Crison (Barcelona).
- Probetas de varios volúmenes.
- Agitadores orbitales, suministrados por Selecta (Barcelona).
- Agitatus tipo Vortex, suministrado por Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Baño de ultrasonidos, suministrado por Selecta.
- Cronómetro.
- Evaporador y tubos de vidrio especiales de la marca Turbo vap, suministrados por Zymark.
- Speed Vac de la marca Savant (Ramsey, MA).
- Centrífuga Modelo BL-S de Meditronic.
- Pipetas Automáticas graduables de 0,1 ml a 1 ml y de 20 μ l a 200 μ l de Finpipette.
- Jeringas de plástico de 2 ml suministrados por Scharlab.
- Filtros de jeringa de 0,45 μ m suministrados por Scharlab.
- Viales de vidrio topacio de 2 ml, cápsulas y encapsulador suministrados por Agilent Technologies.
- Adaptadores y tubos necesarios para SPE suministrados por Supelco.
- Inyector HP 7683 Series (Agilent Technologies).
- Cromatógrafo HP 6890N Network GC System (Agilent Technologies).
- Detector HP 5973 Network Mass Selective Detector (Agilent Technologies).
- Columna J&W Scientific DB-17 (30 m \times 0,25 mm D.I.), 0,25 μ m espesor de película.

3.2.4. MUESTRAS DE SUELOS

Los suelos utilizados para el desarrollo de este capítulo se seleccionaron entre muestras procedentes de diferentes zonas cerealistas de la provincia de Valladolid. En todos los casos las muestras de suelo se recogieron de los horizontes superficiales, aproximadamente en los primeros 15 cm que constituyen la capa arable. Los suelos utilizados como blancos, es decir, sin residuos de herbicidas, se tomaron en una parcela experimental perteneciente al ITACyL donde se había sembrado cebada, no se habían realizado tratamientos con fitosanitarios, y posteriormente se utilizaría para los ensayos de disipación en campo detallados en el Capítulo 5.

Las propiedades físico-químicas de los suelos fueron determinadas en el Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL, que trabaja bajo los criterios generales de calidad de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025, para lo que está acreditado por ENAC. Los análisis realizados para cada tipo de suelo fueron: pH, textura, carbono orgánico oxidable y capacidad de intercambio catiónico mediante métodos internos basados en los métodos oficiales de análisis recogidos en la Orden de 1 de diciembre de 1993, por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aguas, aceites y grasas,

carne y productos cárnicos, fertilizantes, productos fitosanitarios, leche y derivados lácteos, productos orgánicos, suelos y productos derivados de la uva y similares [80].

Para los experimentos previos y el diseño ortogonal se utilizó el mismo suelo, con una composición de 46% de arena, 37% de limo, 17% de arcilla, 0,69% de materia orgánica, pH 8,5 (medido con agua), 9,2 meq/100g de capacidad de intercambio catiónico. La Capacidad de campo: 0,1431, se calcula como el contenido en agua a 0,33 bar, y el Punto de marchitez: 0,0793, como el contenido de agua a 15 bar.

Las muestras de suelo se extendieron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que su humedad se igualó con la ambiental (en todo caso, nunca se secaron en estufa) (Figura 3.2). No se dejaron secar del todo para no favorecer las interacciones del suelo y los herbicidas durante el almacenamiento [81]. Posteriormente, se tamizaron con un tamiz de 2 mm (Figura 3.3) y se congelaron hasta su extracción a -20°C.



Figura 3.2. Bandejas.



Figura 3.3. Tamiz de 2 mm.

Las muestras fortificadas se prepararon contaminando muestras blancas de suelo, previamente descongeladas a temperatura ambiente, con diferentes volúmenes de las soluciones patrón de trabajo de los herbicidas. Se homogenizaron mediante agitación orbital durante 30 min para que los analitos se distribuyeran mejor y se dejó que el disolvente se volatilizara controlándolo mediante pesada. Este procedimiento permitía imitar los residuos envejecidos [28,65].

3.2.5. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO

El análisis de trazas requiere una gran sensibilidad, y LD lo más bajos posible. Debido a esto, la mayoría de los procedimientos de extracción de residuos de herbicidas requieren llevar a sequedad el extracto obtenido de la extracción de las muestras, antes de su análisis. Sin embargo este paso se debe llevar a cabo con mucho cuidado ya que se pueden perder analitos por evaporación. Para evitarlo, se describe la utilización de pequeños volúmenes de disolventes con elevados puntos de ebullición y el uso de temperaturas de evaporación lo más bajas posible [82,83].

Al concentrar en el Turbo vap/Speed vac (Figura 3.4) los extractos obtenidos en la extracción de las muestras, se tuvo siempre en cuenta:

- La recuperación de un volumen exacto de extracto homogéneo que se tenía en cuenta en el cálculo de las tasas de recuperación [84].

- La concentración sin dejar llevar a sequedad total el extracto, para lo que se usaron tubos de vidrio graduados. Se había comprobado que el llevar a sequedad total era muy perjudicial porque, al actuar durante más tiempo la corriente de aire y el baño caliente sobre los extractos, se producían pérdidas de analitos.

Se realizaron estudios de las pérdidas de analitos por evaporación, siguiendo las recomendaciones anteriores. Para ello, se utilizaron patrones de herbicidas de 150 µg/l disueltos en acetonitrilo, ya que era el disolvente que tenía mayor punto de ebullición y, por tanto, el que más tardaba en concentrarse. Se utilizó el mismo volumen de disolución para todas las pruebas, 25 ml, ya que era el mayor volumen que se iba a concentrar en función de las pruebas diseñadas.

Estas pruebas sólo se llevaron a cabo para los herbicidas Neutros y Básicos, no para los Ácidos ya que son polares y poco volátiles. Sus ésteres metílicos tenían una volatilidad mucho mayor pero se formaban después de haber llevado a sequedad los extractos, por lo que este paso no les afectaba.

1. Por una parte, se evaluó el uso de aditivos que redujesen las pérdidas al evaporar. Se añadía 50 µl de etilenglicol al 20% en acetona, alcohol que disminuía las pérdidas de compuestos por volatilización [82].
2. Por otra parte, se ensayaron distintas temperaturas de evaporación (35, 40, 45 y 50°C) en el Turbo vap/Speed vac (siempre con la adición de etilenglicol) para aplicar la temperatura más alta que no produjese pérdidas de analitos.



Figura 3.4. Equipos utilizados para concentrar los extractos, Turbo vap y Speed Vac.

3.2.6. EXTRACCIÓN

3.2.6.1. Experimentos Previos

La extracción de los residuos de herbicidas del suelo se realizó por agitación mecánica (Figura 3.5.) con distintas combinaciones de disolventes orgánicos, agua y modificadores. La agitación orbital tiene la ventaja de ser una técnica universal, que no requiere grandes inversiones, está muy extendida y proporciona resultados adecuados.

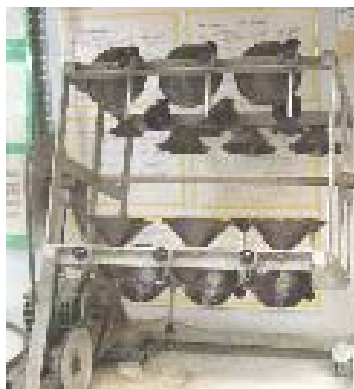


Figura 3.5. Agitador orbital usado para la extracción.

Algunos herbicidas Fenoxiácidos estaban presentes simultáneamente en forma de ácido y éster, como ya se vio en el Capítulo 2. Debido a la doble formación de los ésteres metílicos, por esterificación a partir de los ácidos y por trans-esterificación a partir de los ésteres [85], todos los experimentos se llevaron a cabo por separado para los herbicidas ácidos por una parte (compuestos del 1 al 12 en la Tabla 3.2), y para los básicos y neutros por otra (compuestos del 13 al 37 en la Tabla 3.2), con el objetivo de saber a partir de que forma se había obtenido el éster metílico y, por tanto, cual era la forma recuperada.

En la Tabla 3.3 se muestran las pruebas previas diseñadas para caracterizar la influencia de las variables que serían optimizadas después con el diseño ortogonal.

Tabla 3.3. Resumen de la composición de las mezclas de disolventes, agua y modificadores ensayados en las pruebas previas.

Suelo (g)	Pruebas Previas	% Modificador	Disolvente (ml)	Agua (ml)	Ratio	pH Disolvente	pH (Suelo+ Disolvente)
	Ac		47,50			7,20	7,23
	NaOH 0,5N LLP pH 2			47,50		13,02	11,70
	Ac:H ₂ O LLP		40,0	7,50		7,20	7,23
	Ac:H ₂ O LLP pH2		40,0	7,50		7,20	7,23
15	Ac:HAc	1,0	47,5		1:3,2	4,14	5,20
	Ac:H ₂ O:HAc LLP	1,0	40,0	7,50		4,14	5,20
	Ac:H ₂ O:HAc LLP pH2	1,0	40,0	7,50		4,14	5,20
	Ac:NH ₃	0,1	47,5			9,50	9,10
	Ac:H ₂ O:NH ₃ LLP	0,1	40,0	7,50		9,50	9,10

Estos experimentos fueron diseñados teniendo en cuenta la serie de Kovacs de la extracción en la que se utilizaban disolventes orgánicos en mezclas con agua, ácidos y bases, para aumentar progresivamente la fuerza de la extracción [86], además de experimentar la adición de varios modificadores encontrados en la bibliografía [46,61]. Se escogió la acetona como único disolvente para estas pruebas previas ya que era medianamente polar, soluble con el agua y se usa ampliamente para la extracción de

herbicidas [75], lo que permitía hacerse una idea general de los resultados. Como modificadores se usaron el ácido acético y el amoníaco. El porcentaje de los modificadores se ajustó en función del pH obtenido en las mezclas de los disolventes con el suelo. Se ajustaron todas las cantidades de tal manera que fueran equivalentes para poder comparar las recuperaciones.

Se tomó en un frasco de vidrio topacio de 100 ml, una muestra representativa de 15 g de suelo [87] contaminada a un nivel de 0,05 mg/kg y se agitó con un agitador orbital durante 1 h con las diferentes combinaciones de la Tabla 3.3. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min, y un volumen equivalente a 8 g de muestra se concentró a 35°C. Antes de la evaporación se añadieron al extracto 50 µl de una disolución de etilenglicol al 20% en acetona. Posteriormente, se añadió acetona con 1% de ácido acético al extracto concentrado hasta una concentración equivalente a 8 g suelo/ml de extracto, se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,45 µm, y se añadió el patrón interno, previamente al análisis por GC-MS.

En las pruebas donde se usaba agua, se añadió un volumen fijo de 7,5 ml, suficiente para mojar la muestra de 15 g de suelo. Se mezcló y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente para que empapara bien el suelo, previamente a la adición de las mezclas de disolventes, agitación durante 1 h y se centrifugación a 2500 rpm durante 5 min. Era necesario eliminar el agua antes del análisis, ya que los extractos con agua dañan la fase estacionaria de GC y producen picos cromatográficos de poca calidad [88]. Para ello, el sobrenadante se repartió con 30 ml de diclorometano añadiendo suficiente Na₂SO₄ anhidro para unirse al agua. Después de filtrar el extracto a través de un filtro con lana de vidrio y más Na₂SO₄ anhidro, se llevó a sequedad un volumen equivalente a 8 g de suelo, según se describirá en los resultados de las pruebas de concentración del extracto.

El reparto con diclorometano se realizó con y sin acidificación previa del extracto a un valor de pH 2, para estudiar si los analitos ácidos se perdían en la fase acuosa o se recuperaban en la fase orgánica con las diferentes combinaciones de disolventes estudiadas. Este reparto se ha descrito sin ajustar el pH para los analitos no iónicos y básicos [89], mientras que para los ácidos se han encontrado métodos con ajuste a pH 2 [58,75,90] y sin ajuste [60]. Este paso también servía para purificar el extracto de interferencias polares.

Las extracciones que se denominaron “específicas”, fueron el uso de acetona para los herbicidas básicos y neutros, y la extracción alcalina con NaOH 0,5 M para los herbicidas ácidos, en donde el extracto se acidificaba a pH 2 antes del reparto con diclorometano [53].

Hay autores que aseguran que la extracción de muestras contaminadas en el laboratorio no representa la extractabilidad de muestras reales. Sin embargo, son válidas para comparar los distintos métodos empleados, ya que se han contaminado de la misma manera [20]. Para estudiar la efectividad real de estas combinaciones de disolventes, agua y modificadores en la extracción de residuos de herbicidas, se extrajeron muestras reales de suelo recogidas en un ensayo de disipación en campo donde se realizaron tratamientos herbicidas en un campo de cebada pertenecientes al 1^{er} ensayo en campo detallado en el Capítulo 5.

3.2.6.2. Diseño ortogonal

En la Tabla 3.4 se muestran los valores de las variables que se utilizaron para el diseño. Se tomaron en función de los resultados de las experiencias previas, puesto que el óptimo en los diseños ortogonales se alcanza paso a paso y el conocimiento previo siempre es muy importante para definir las adecuadamente.

Tabla 3.4. Factores y niveles para el diseño ortogonal.

Notación	Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
<i>A</i>	Disolvente + Agua	Acetona (Ac)	Acetato de etilo (AcE)	Acetonitrilo (AcN)
<i>B</i>	% Ácido acético (HAc)	0,5	1	2
<i>C</i>	Volumen (ml)	15 (1:1,5)	30 (1:2,5)	45 (1:3,5)
<i>D</i>	Tiempo Agitación (seg)	15	30	60

Se tomaron tres niveles para cada factor en lugar de dos para detectar cualquier relación no lineal entre los factores y la variable de salida. El diseño con 4 factores y 3 niveles se ajustó a una matriz $L_9(3^4)$ que era la que proporcionaba la mayor información con el menor número de experiencias (Tabla 2.4). Este diseño implicaba que se debían realizar 9 experiencias, que se duplicaron para calcular el error residual. El orden en que se llevaron a cabo los experimentos se aleatorizó previamente para no introducir ningún error sistemático.

Se tomaron 15 g de suelo contaminados con 0,05 mg/kg en un frasco topacio de 100 ml y se les añadió 7,5 ml de agua. Se mezclaron bien y se dejó reposar la mezcla 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se agitaron con la mezcla ensayada durante el tiempo adecuado, se centrifugaron, y el sobrenadante se repartió con 30 ml de diclorometano al que se añadió suficiente Na_2SO_4 anhidro para unirse al agua. Después de filtrar el extracto a través de un filtro con lana de vidrio y más Na_2SO_4 anhidro, se llevó a sequedad un volumen equivalente a 8 g de suelo según se describirá.

3.2.7. LIMPIEZA DE MUESTRA

Debido a las interferencias que aparecían en los extractos de suelo, se evaluó la limpieza de los extractos obtenidos con el método de extracción optimizado mediante el uso de SPE para los herbicidas neutros y básicos en un primer acercamiento, y, mediante dSPE para todos los herbicidas conjuntamente.

3.2.7.1. Extracción en Fase Sólida (SPE)

Se evaluó el uso de SPE con cartuchos que contenían varios materiales adsorbentes. El principal problema era que los herbicidas eran de características muy diferentes y los cartuchos funcionaban por polaridades, de manera que era muy difícil encontrar una limpieza universal.

Para estudiar la efectividad real de los distintos adsorbentes para retener los herbicidas estudiados, se prepararon extractos de suelo blancos extraídos con el método resultante de la optimización, se concentraron, y se redisolviéron en 1 ml de acetona acidificada con 1% de ácido acético que contenía el patrón de los herbicidas en una concentración de 0,1 mg/l, de tal manera que el extracto final simulaba la extracción total de los

analitos. En la Tabla 3.5 se muestra un esquema de los adsorbentes usados en las pruebas de SPE.

Aquellos adsorbentes cuyo mecanismo de retención era la fase reversa, necesitaban que la carga de la muestra se produjera en una matriz acuosa. Para ello, se añadían 19 ml de agua al ml del extracto final en acetona, para que la fase orgánica fuera menor o igual al 5% en la carga en el cartucho, lo que aumentaba la retención de los analitos en la fase reversa [91].

Los distintos tipos de cartuchos se usaron según las condiciones optimizadas especificadas por los fabricantes y se compararon con extractos blancos de suelo extraídos de la misma manera, llevados a sequedad y contaminados con la misma concentración de herbicidas a los que no se les había aplicado limpieza.

Todas las pruebas se redisolviéron en acetona:ácido acético para su posterior análisis por GC-MS.

Tabla 3.5. Adsorbentes usados en las pruebas de SPE. Hx: Hexano, IsOH: Isopropanol, dEE: Éter dietílico.

Fase	Cartucho	Acondicionamiento	Muestra	Lavado	Secado	Elución
Normal	Florisil	10 ml Hx	20 ml Hx-1 ml extracto	10 ml Hx-5% MeOH		5 ml Ac
	C18ne					5 ml MeOH/AcN/AcE
Reversa	Oasis HLB	10 ml MeOH + 10 ml H ₂ O	20 ml Agua-1 ml extracto	10 ml H ₂ O-5% MeOH	vacío	7 ml (6IsOH:4AcN) / 6 ml (9MeOH:1dEE)
	Strata X					7 ml MeOH:AcN
	Nexus	NO			1 ml H ₂ O	5 ml MeOH

3.2.7.2. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (dSPE)

Se probaron dos adsorbentes en polvo sobre extractos blancos de suelo a los que se le añadían los patrones de la misma manera y en la misma concentración que para las pruebas de SPE, para evaluar la limpieza y la retención. La diferencia con SPE consistía en que no era necesario usar cartuchos, sino que el adsorbente se añadía directamente al extracto, se agitaba, se centrifugaba y se recogía el extracto limpio y preparado para su análisis.

No se encontraron referencias en la bibliografía que usasen este tipo de limpieza con extractos de suelo, por lo que se adaptaron los tipos de adsorbentes y las cantidades que especificaba el método *QuEChERS* para extractos de material vegetal [87], método de extracción que se detallará en el Capítulo 4. Los extractos en este método no se concentran, por lo que 1 ml contiene 1 mg de muestra, para el que se usa 25 mg de PSA, para limpiar el extracto, y 150 mg de MgSO₄, para eliminar bien el agua que pudiera permanecer en éste. Como ya se había eliminado el agua en un paso anterior de los extractos de suelo, únicamente se usaron 200 mg de adsorbente en polvo para la limpieza de los herbicidas, el equivalente a los 8 g de suelo que contiene el ml del extracto obtenido con el método de extracción optimizado para el suelo. Los adsorbentes ensayados son la amina primaria-secundaria (PSA) y el negro de carbono grafitizado (GCB).

3.2.8. ANÁLISIS

En todas las experiencias se llevó a sequedad un volumen de extracto equivalente a 8 g de suelo, que se redisolvió en 1 ml de acetona:1% de ácido acético y se dividió en dos alícuotas de 0,5 ml. Una de ellas se analizó directamente y a la otra se le añadió 0,1 ml de TMSH para derivatizar los ácidos a sus correspondientes ésteres metílicos, previamente al análisis por GC-MS, como ya se describió en el Capítulo 2. El pH final de todos los extractos después de llevar a sequedad y redissolver en 1 ml de acetona:1% de ácido acético fue de 3,2 independientemente de la mezcla extractante utilizada. De la misma manera, el pH aumentó hasta 6 con la adición de TMSH para todas las experiencias, asegurando que se metilaban adecuadamente los ácidos antes de su inyección en GC [85].

Todas las muestras se cuantificaron con calibrados en matriz preparados con blancos de suelo extraídos de la misma forma que las muestras en cada prueba, para corregir la presencia de interferencias de la matriz [82]. Se añadían los patrones del calibrado sobre 0,9 ml del extracto blanco de matriz.

La concentración de herbicida presente en el suelo se calculó comparando las respuestas relativas (al patrón interno) obtenidas en las muestras, con las de los patrones en los calibrados en matriz y aplicando la siguiente fórmula:

$$C(\text{mg} / \text{Kg}) = C(\text{mg} / \text{L}) \times \frac{V}{P}$$

C(mg/L) = valor de la concentración obtenida de la recta de calibrado

V = volumen empleado para redissolver el residuo (ml) = 1 ml

P = peso del suelo en el extracto (8 g)

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO

En la Figura 3.6 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la adición de 50 μ l de etilénglicol al 20% en acetona, a patrones de herbicidas neutros y básicos en 35 ml de acetonitrilo frente al mismo patrón llevado a sequedad sin el uso del etilénglicol, siendo la temperatura de concentración de 35°C.

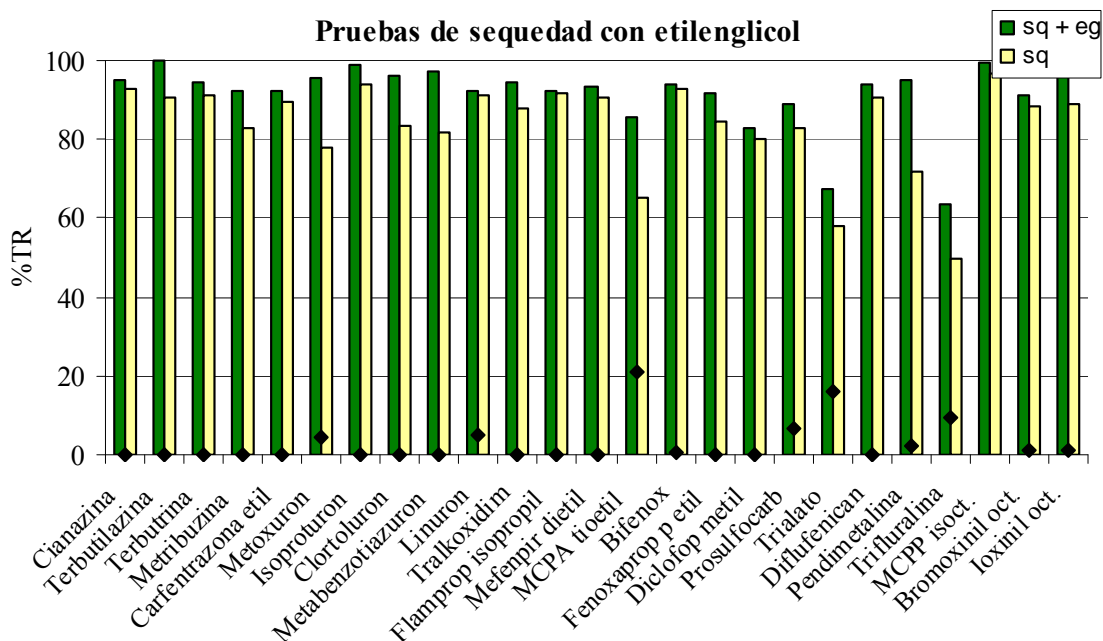
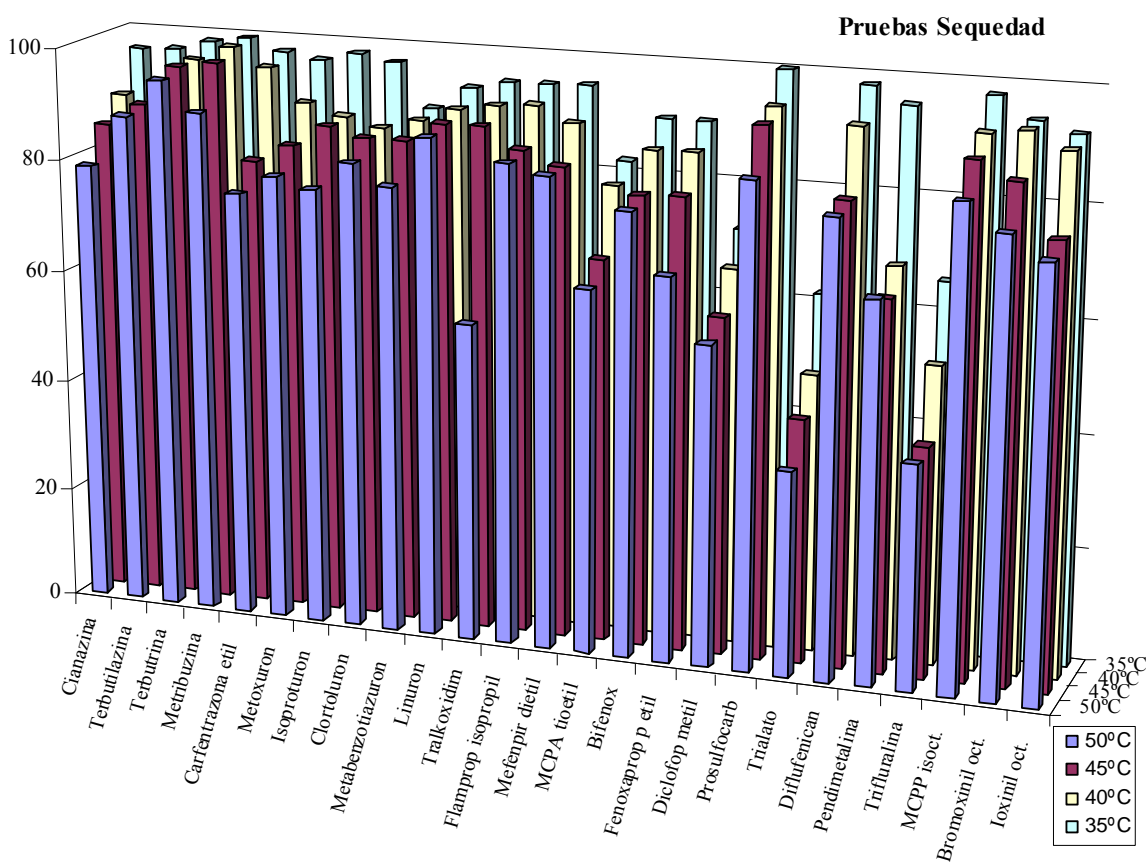


Figura 3.6. Resultados del uso del etilénglicol al llevar a sequedad disoluciones patrón de herbicidas neutros y básicos (sq = sequedad, eg = etilénglicol al 20% en acetona).

En el gráfico se han representado en forma de puntos, las presiones de vapor de los herbicidas en mPa a 25°C (datos en la Tabla 2.1). Los herbicidas se han ordenado de mayor a menor polaridad. Se aprecia que los más apolares fueron los más volátiles (la mayor parte estaban en forma de ésteres que tienen mayor presión de vapor) y, por tanto, los que mayores pérdidas sufrían por evaporación y más beneficio obtenían del uso del etilénglicol. Esta pérdida fue especialmente importante para la Trifluralina y el Trialato.

Los resultados de las pruebas de las temperaturas de evaporación (siempre con la adición de etilénglicol), se han representado en la Figura 3.7. Se seleccionó la temperatura de 35°C, que aunque era la más baja, y, por tanto, la que más tiempo tardaba en concentrarse, también era la que producía menores pérdidas. Además hay que tener en cuenta que el método optimizado usaba acetona, disolvente más volátil que el acetonitrilo, y los extractos tardaban menos en concentrarse.

Figura 3.7. Diferencias y Recuperaciones entre los herbicidas al concentrarlos a diferentes temperaturas.



3.3.2. EXTRACCIÓN

3.3.2.1. Experimentos Previos

Se desarrollaron para proporcionar una visión global de las variables relacionadas con la extracción de los diferentes herbicidas en las muestras de suelo, que posteriormente se optimizarían.

Análisis de Componentes Principales (ACP)

Al plantear por primera vez una experimentación no es extraño encontrar una larga lista de factores potencialmente influyentes. Puesto que el número de experimentos que suele requerir un estudio detallado aumenta exponencialmente con el número de factores estudiados, es necesario reducir la lista de factores a un número manejable. Se deben cribar en función de su influencia en la respuesta considerando su significancia estadística. Para determinar dicha influencia, se puede realizar una investigación exploratoria con experimentos analizados mediante un método estadístico sencillo, como por ejemplo, el Análisis de Componentes Principales (ACP). El ACP permite estudiar la estructura de una matriz de datos para buscar relaciones entre objetos y variables. Pueden observarse las muestras (existencia de grupos, muestras discrepantes,

tendencias); las variables (correlación entre ellas, importancia relativa), e incluso la relación entre muestras y variables.

Por tanto, se aplicó un ACP a los valores medios de las recuperaciones de 5 réplicas obtenidos en los experimentos previos, con la idea de proporcionar una visión global de las relaciones entre las variables en relación a los procedimientos de extracción.

Las recuperaciones medias obtenidas en la extracción con acetona de los herbicidas básicos y neutros, y las obtenidas con la extracción alcalina para los herbicidas ácidos, se usaron conjuntamente como resultados del llamado método específico.

El análisis estadístico se realizó con el programa Minitab v.13.0 con el método *Ward linkage* y sin usar ninguna rotación (*none rotation option*). Los eigenvalores de la matriz de correlación se muestran en la Figura 3.8.

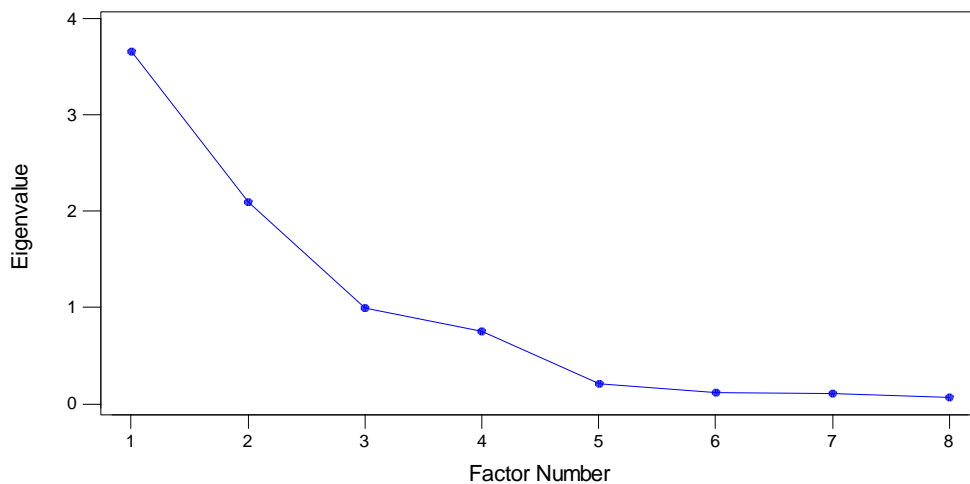


Figura 3.8. Gráfico de los eigenvalores obtenidos a partir del ACP de los datos de los 8 experimentos previos.

El ACP disminuye la dimensionalidad del conjunto de variables originales a un número más pequeño de variables compuestas. Esto se consigue si los primeros componentes principales contemplan la mayor parte de la información y son suficientes para representar las muestras de un modo satisfactorio. Entonces se pueden rechazar los componentes principales restantes. Con ello, cada muestra pasa a estar caracterizada por un menor número de variables y se comprimen los datos. La compresión aprovecha la correlación entre las variables. Cuanto más cerca están estos valores del 100%, más contribuyen al componente, es decir, esta variable contribuye mucho al eje del componente.

A partir del ACP se encontró que el 93,8% de la variación del conjunto de datos podía explicarse usando 4 factores. A partir de la contribución de las variables a los 4 factores compuestos del ACP se extrajeron algunas conclusiones (Tabla 3.6). El componente 1 tenía contribuciones de aquellos procedimientos que extraían mayoritariamente herbicidas básicos y neutros, mientras que los más específicos para ácidos contribuían mayoritariamente al Componente 2. Los Componentes 3 y 4 estaban formados por contribuciones de los métodos específicos y por la combinación de acetona, ácido acético y agua para todos los herbicidas de estudio.

Tabla 3.6. Contribución de las variables a los 4 factores compuestos del ACP de los resultados de las extracciones con distintas combinaciones de disolventes orgánicos, agua y modificadores. Las contribuciones menores a $|0,35|$ se omiten.

Variables	Componentes			
	1	2	3	4
Específico (Specific)		-37,89	-82,52	-35,91
Ac:H ₂ O LLP (W)	-92,51			
Ac:H ₂ O LLP pH2 (W:pH2)		-90,25		
Ac:HAc (HAc)	-92,58			
Ac:H ₂ O:HAc LLP (HAc:W)		-50,72	51,77	-64,08
Ac:H ₂ O:HAc LLP pH2 (HAc:W:pH)		-90,82		
Ac:NH ₃ (NH₃)	-94,85			
Ac:H ₂ O:NH ₃ LLP (NH₃:W)	-88,78			
%Var	45,80	26,20	12,40	9,40

ACP busca unos nuevos ejes, denominados *componentes principales*, que son una rotación de los tres ejes de coordenadas iniciales. De este modo, cada muestra también se puede caracterizar por sus coordenadas – denominadas puntuaciones o *scores* en inglés - sobre estos nuevos ejes. Uno de los ejes (que se denomina *primer* componente principal, o PC₁), se orienta en la dirección de máxima variación (dispersión) de los puntos. De este modo, las coordenadas de las muestras sobre el PC₁ (la proyección de los objetos sobre la línea) preservan al máximo la estructura original de los datos. El segundo eje (PC₂) también se orienta en la dirección de la máxima dispersión. Pero, como debe ser perpendicular al primer eje, sigue la dirección de la máxima dispersión *residual* que no ha explicado el PC₁.

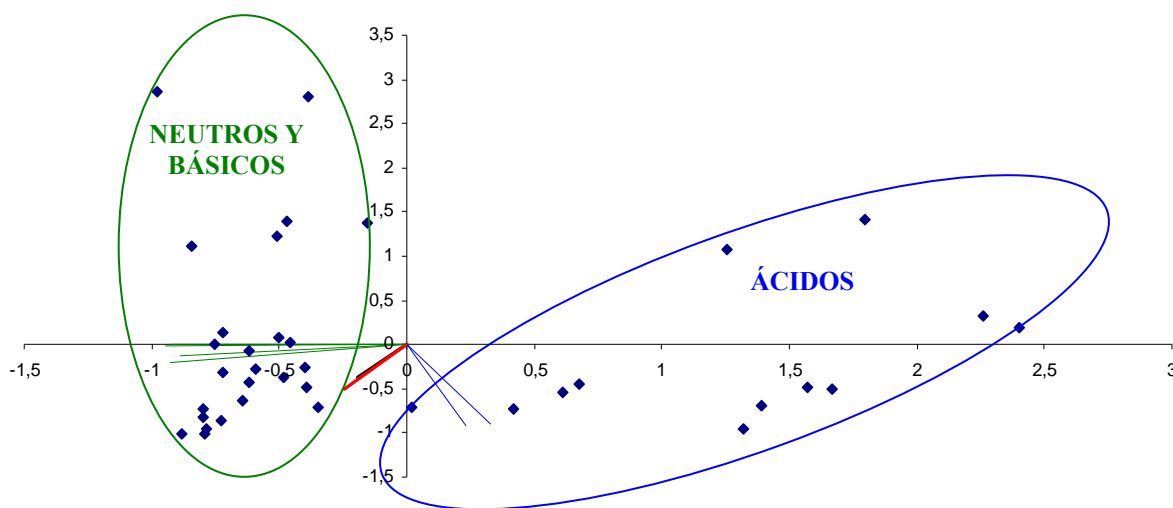


Figura 3.9. Gráfico de los dos factores resultado del ACP para todos los herbicidas. Las contribuciones de los 8 métodos diferentes se han representado como líneas.

Se representaron estas contribuciones individuales en un plano de dos dimensiones formado por los dos nuevos ejes principales, PC₁ y PC₂. El ACP agrupó los herbicidas en función de su naturaleza química (Figura 3.9). Los herbicidas ácidos se agruparon

separadamente de los básicos y neutros, que no mostraron una tendencia diferente entre ellos, lo que implicaba que se extraían con los mismos procedimientos, a diferencia de los herbicidas ácidos que necesitaban métodos de extracción más específicos.

Aquellos métodos que usaban ajuste de pH 2 antes del reparto, se orientaban hacia los herbicidas ácidos (en azul) mientras que los que usaban acetona en combinación con agua o amoníaco se orientaban al grupo de los básicos y neutros (en verde).

Los métodos específicos (en negro) y la combinación de acetona, agua y ácido acético (en rojo) tenían la misma dirección y su dirección de máxima dispersión se encontraba entre el agrupamiento ácido, y el básico y neutro, lo que podría indicar que esta combinación era adecuada como multirresiduo.

El mismo resultado se encontró para el análisis de agrupaciones (*clusters*) (Figura 3.10), que agrupaba los procedimientos en función de su similitud; los métodos para herbicidas básicos y neutros, los métodos con ajuste de pH 2 antes del reparto, para los herbicidas ácidos y, los métodos específicos y la combinación de acetona, agua y ácido acético para todos los herbicidas conjuntamente.

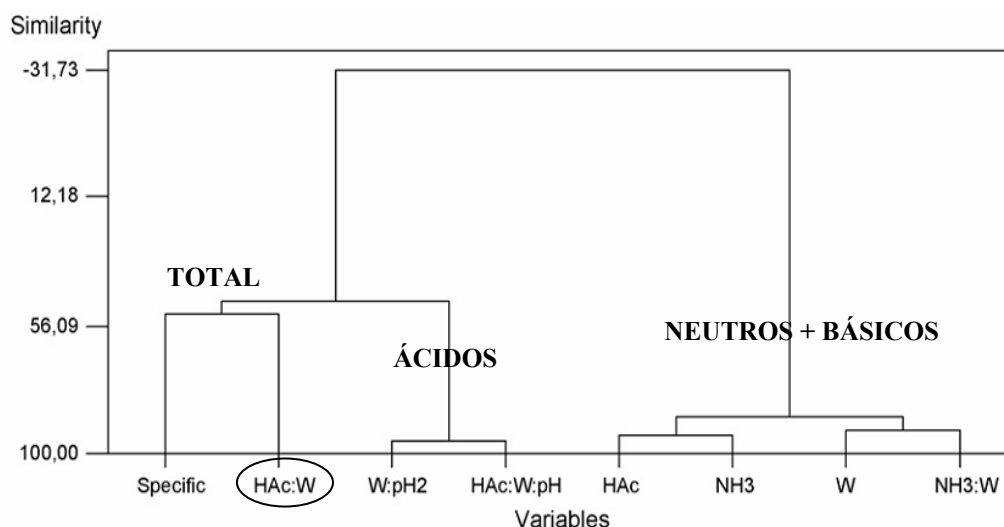


Figura 3.10. Representación de las variables para los 8 métodos de extracción estudiados. La leyenda de los métodos se presenta en la Tabla 3.6.

Medida del pH

Las medidas de pH en las mezclas de disolventes orgánicos con agua y modificadores se realizaron directamente ya que el electrodo de vidrio respondía casi idealmente al pH en metanol, acetonitrilo, agua y mezclas de estos disolventes [92]. La diferencia en el pH era menor de 0,1 unidades de pH para mezclas que contenían hasta el 50% de disolvente orgánico pero podían ser mayores cuando había muy poco agua en la mezcla [92].

Sin embargo, las medidas de pH en las combinaciones de suelo-disolventes orgánicos-modificadores se realizaron añadiendo una cantidad apropiada de agua hasta conseguir una relación de (1:2,5) (g de suelo/ml de agua) [90], independientemente del volumen de extracción estudiado. Se agitaron las mezclas 10 min en un agitador orbital, se mantuvieron 30 min a temperatura ambiente y el pH se midió directamente en el sobrenadante con el electrodo de vidrio.

El volumen de modificador añadido se calculó teniendo en cuenta el pH de la combinación del suelo con la mezcla de disolventes (Tabla 3.3). Los porcentajes del ácido acético y del amoníaco son críticos debido a la rápida degradación que sufren algunos herbicidas a valores extremos de pH (por ejemplo, el Tribenuron metil a pH menor de 4 [53,73,74], los tiocarbamatos hidrolizados en medio básico [5], y algunos ésteres también hidrolizados a sus correspondientes ácidos a pH mayores de 9 [93]). Por tanto se seleccionó 1% de ácido acético, que proporcionaba un valor de pH 5 en el suelo, y 0,1% de amoníaco con un valor de pH 9, aunque se habrían podido seleccionar otros porcentajes más extremos siempre que la extracción se desarrollase lo suficientemente rápido [61,73].

Recuperaciones

Las recuperaciones de los herbicidas básicos y neutros se promediaron conjuntamente, ya que se comportaban igual. Las diferencias significativas entre las recuperaciones obtenidas por los diferentes procedimientos se examinaron aplicando una ANOVA. Las medias seguidas de diferentes letras en la misma columna eran significativamente diferentes a $p < 0,01$, según el test de Tukey para igual número de réplicas (Tabla 3.7).

La combinación de acetona, agua y ácido acético fue significativamente la más efectiva para extraer la totalidad de los herbicidas de estudio, además de los métodos específicos. Las mejores recuperaciones para los herbicidas ácidos se encontraron para las combinaciones de agua y ácido acético, además de las que usaban un reparto previo ajuste a pH 2. Sin embargo, estos dos últimos métodos fueron los menos efectivos a la hora de extraer los analitos básicos y neutros, que fueron significativamente recuperados por el resto de procedimientos. Las recuperaciones de los herbicidas básicos no mostraron un incremento con el amoníaco, como se esperaba [61]. La simple adición de agua no recuperó más residuos que el disolvente orgánico sólo, a pesar de lo encontrado en las referencias [38].

Sin embargo, la adición de agua en combinación con el ácido acético y la acetona, mejoró sensiblemente la recuperación de los herbicidas ácidos, sin detrimento de la recuperación de los básicos y neutros, y sin la necesidad de ajustar el pH previamente al reparto con diclorometano.

Tabla 3.7. Recuperaciones de muestras de suelos contaminadas a nivel de 0,05 mg/kg con Ácidos y Básicos + Neutros, y extraídas con las diferentes pruebas diseñadas. Se ha señalado la más adecuada como multiresiduo.

Suelo (g)	Pruebas Previas	% Total	%CV (n=5)	% Ácidos	%CV (n=5)	%Bs + %N	%CV (n=5)
15	Ac NaOH 0,5N LLP pH 2	97,55a	0,49	95,09a	0,90	98,72a	0,64
	Ac:H ₂ O LLP	81,12d	0,86	49,62c	3,69	96,24ab	1,41
	Ac:H ₂ O LLP pH2	86,55c	1,16	97,34a	1,88	81,37d	0,90
	Ac:HAc	87,37c	2,51	60,81b	4,65	100,12a	1,90
	Ac:H ₂ O:HAc LLP	92,70b	0,77	92,42a	0,86	92,84b	0,75
	Ac:H ₂ O:HAc LLP pH2	89,72bc	0,61	97,08a	0,57	86,19c	1,21
	Ac:NH ₃	69,77e	0,60	20,79d	8,33	93,29b	1,04
	Ac:H ₂ O:NH ₃ LLP	78,58d	1,09	47,19c	2,13	93,64b	0,85

Los mismos resultados se encontraron para las muestras reales del 1^{er} ensayo en campo desarrollado en el Capítulo 5 (Tabla 3.8). Los mejores resultados fueron obtenidos significativamente con el método que posteriormente se optimizó.

Tabla 3.8. Concentración de residuos de herbicidas en muestras de suelo de un campo de cebada tratado con fitosanitarios. Los resultados se han expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$. En negrita se señala la prueba más adecuada como multirresiduo.

Nº	Herbicida	Ac:HAc	Ac:H ₂ O LLP	Ac:H₂O:HAc LLP	Ac:H ₂ O:NH ₃ LLP
1	Isoproturon	106,4b	258,0a	265,1a	38,5c
2	Triatato	105,7a	70,9b	112,3a	106,6a
3	Terbutrina	109,1ab	92,5b	115,4a	92,5b
4	Pendimetalina	211,9c	241,4b	265,7a	222,3c
5	Flamprop	30,3b	46,0a	46,3a	28,3b
6	Bromoxinil	56,2c	88,6b	114,4a	58,8c

3.3.2.2. Diseño Ortogonal

Diseño

Después de estudiar detalladamente los resultados obtenidos a partir de los experimentos previos, se seleccionaron las siguientes variables: tipo de disolvente y proporción, pH (porcentaje de ácido acético), y tiempo de agitación. Se escogieron la acetona [75], el acetato de etilo [49,53], y el acetonitrilo [89] ya que están entre los disolvente orgánicos más utilizados en la extracción de herbicidas básicos y neutros del suelo. El amoníaco no se seleccionó puesto que se había demostrado que no proporcionaba ninguna ventaja. Se utilizó el mismo volumen de agua que en los experimentos previos ya que era adecuado. Debido a que se tomaron diferentes volúmenes de disolventes, la proporción de agua añadida en cada experimento varió entre 14,3% y 33,3%, la del ácido acético entre 0,3% y 1,7%, y los disolventes orgánicos entre 65,3% y 85,3%, cubriendo el rango de valores encontrado en la bibliografía [43,60,61,16,94].

La media de las tasas de recuperación se utilizó como variable a optimizar. Se seleccionaron dos variables de salida debido a la doble formación de ésteres metílicos [85], y los dos diseños ortogonales desarrollados para los analitos Ácidos, por un lado, y Básicos y Neutros, por otro. La Tabla 3.9 muestra el diseño de la matriz y las medias de las recuperaciones obtenidas para las dos réplicas de las 9 experiencias.

A partir del estudio de estos datos experimentales con una ANOVA, se identificaron las fuentes individuales de variación y se calculó la contribución de cada factor a la variación de la respuesta (Tabla 3.10).

Las ANOVAs de los datos de las recuperaciones de ambas matrices revelaron que el factor A, el tipo de disolvente, es el que más contribuía a la variabilidad de las recuperaciones (49,1% para los ácidos y 67,2% para los básicos y neutros).

Tabla 3.9. Diseño ortogonal experimental $L_9(3^4)$ con los factores y niveles experimentados para las dos matrices por separado.

Prueba	Factores y Niveles				Ácidos	Básicos y Neutros
	A (Dislv)	B (%HAc)	C (ml)	D (seg)		
1	Ac	0,5	15	15	80,13	100,54
					77,64	100,84
2	Ac	1	30	30	93,34	93,65
					92,12	94,40
3	Ac	2	45	60	94,18	83,12
					94,30	83,34
4	AcE	0,5	30	60	69,67	76,73
					69,51	76,59
5	AcE	1	45	15	74,86	67,68
					74,35	68,83
6	AcE	3	15	30	81,77	78,15
					82,54	79,28
7	AcN	0,5	45	30	79,73	84,77
					80,23	85,91
8	AcN	1	15	60	88,13	93,67
					88,21	93,84
9	AcN	3	30	15	93,83	86,46
					92,97	87,08

Tabla 3.10. ANOVA para el análisis *pooled* de la media de las recuperaciones para los Ácidos, Básicos y Neutros.

Fuente de Variación	A. Disolv. + Agua	B. % Ácido Acético	C. Volumen	D. Tiempo Agitación	Residuales	Total
Grados de Libertad	2	2	2	2		8
Ácidos	Suma de cuadrados	313,14	293,88	10,01	10,88	1260,59
	Varianza (F) ^a	87,42	82,05			
	Pool	No	No	Yes	Yes	Yes
	Pooled Suma de cuadrados	619,11	580,59			60,89
	Contribución (%) ^b	49,11	46,06			4,83
Básicos + Neutros	Suma de cuadrados	1055,34	65,30	441,03	3,99	1567,96
	Varianza (F) ^a	923,58	57,15	385,96		
	Pool	No	No	No	Yes	Yes
	Pooled Suma de cuadrados	1054,20	64,16	439,89		9,71
	Contribución (%) ^b	67,23	4,09	28,05		0,62

^a La varianza crítica para un 95% de confianza es 19,00.

^b La contribución se define como $100 \times (\text{pooled suma de cuadrados/suma de cuadrados total})$.

Las Figuras 3.11 y 3.12 muestran los efectos de los niveles de los factores de control en la variable de salida. Se aprecia que el tiempo de extracción (D) tenía poca influencia en la recuperación y una variación en su valor tenía muy poca influencia en la extracción multirresiduo de los herbicidas. Sin embargo, el efecto marcado del tipo de disolvente (A) para todos los analitos, el porcentaje de ácido acético para los ácidos (B), y el volumen de disolvente (C) para los básicos y neutros, se observa en las gráficas ya que los valores de las recuperaciones cambiaban al cambiar las variables.

El nivel que proporcionaba las máximas recuperaciones era el A₁, la acetona. En contraste a la acetona y al acetonitrilo, el acetato de etilo es prácticamente inmisible con el agua, y se puede eliminar únicamente con la adición de Na₂SO₄ anhidro como agente desecante. Sin embargo, también se le aplicó el reparto con diclorometano para hacer comparables los experimentos y poder aprovechar la limpieza de interferencias polares que proporcionaba este reparto. Por otra parte, se ha encontrado en la bibliografía que los herbicidas con grupos tioéter se degradaban en acetato de etilo, aunque este efecto no pudo ser claramente observado [95].

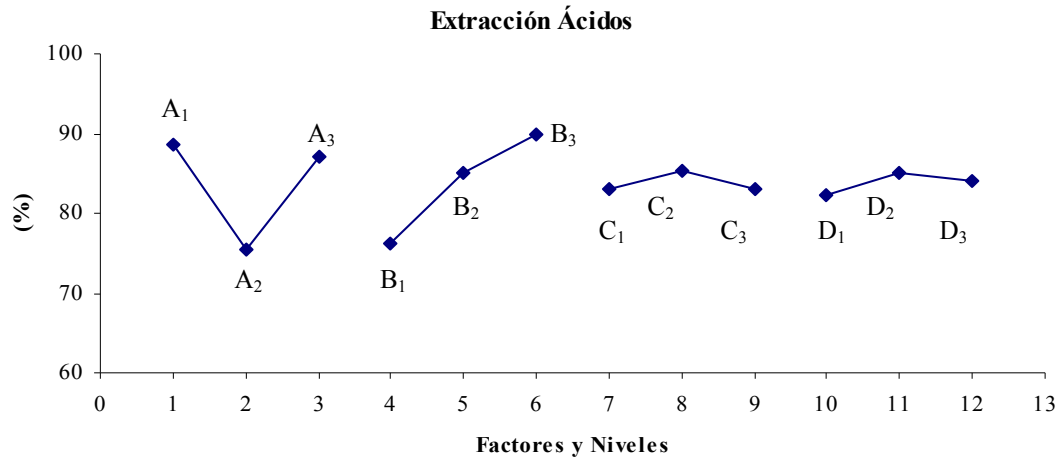


Figura 3.11. Efecto de la interacción de los factores de control en la recuperación media para los Ácidos.

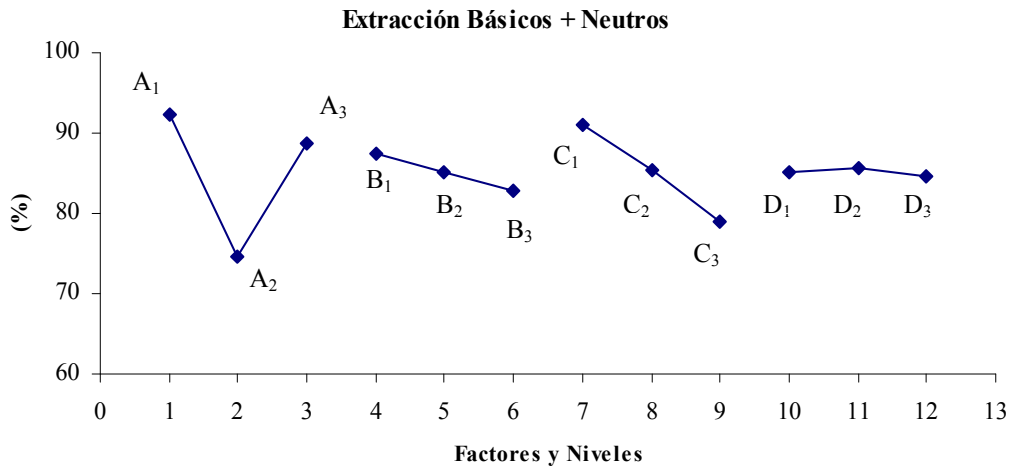


Figura 3.12. Efecto de la interacción de los factores de control en la recuperación media para los Básicos y Neutros.

Los herbicidas ácidos estaban muy influidos por el porcentaje del ácido acético (46,06%), mientras que la contribución para los básicos y neutros fue pequeña (4,09%). La máxima recuperación de ácidos se obtuvo para el nivel B₃ (2% de ácido acético), mientras que el nivel B₁ (0,5% de ácido acético) era el mejor para básicos y neutros.

Se midió el pH de la mezcla del suelo con las distintas combinaciones de disolventes usadas, añadiendo un volumen apropiado de agua para alcanzar la proporción (1:2,5) [90], según se expuso previamente. La adición del ácido acético disminuía el pH del

suelo desde 8,5 hasta 5,7 con 0,5% de ácido acético, a un valor de 5,2 con 1%, y hasta un valor de 5 con 2% de ácido. El pH del suelo regula la carga electrostática de los coloides del suelo y la ionización o protonación de las moléculas de herbicidas, lo que controla el comportamiento y la degradación de los herbicidas en el suelo [15]. Los Fenoxiácidos y las Sulfonilureas se comportan como ácidos débiles y no se ionizan completamente, existiendo en su forma iónica en la mayoría de los suelos agrícolas [18].

Se escogió 1% de ácido acético porque creaba un ambiente medianamente ácido. Las modificaciones en la adsorción con el pH son moderadas para las moléculas neutras, que son principalmente retenidas por la materia orgánica, mientras que son muy importantes para las moléculas cargadas, especialmente para las aniónicas [15]. Si el pH disminuye mucho, los herbicidas ácidos aniónicos se protonan, reduciendo las fuerzas repulsivas presentes cuando la molécula está en forma iónica [16], y, por tanto, incrementando la adsorción molecular [15]. Por otra parte, los herbicidas básicos se protonan a valores bajos de pH, y estos cationes están fuertemente adsorbidos por las interacciones electrostáticas sobre los coloides cargados negativamente, a saber, arcillas y materia orgánica [20,22].

No se realizó un ajuste de pH previamente al reparto con diclorometano, ya que la adición de ácido acético incrementaba la recuperación de ácidos en este paso. Los disolventes de polaridad media tienen constantes dieléctricas bajas, y por tanto, son bases más débiles que el agua y difieren en su habilidad para disociar iones, lo que provoca diferentes valores de pKa entre el agua, y las mezclas de agua y disolventes orgánicos [92]. Los ácidos débiles neutros como el ácido acético normalmente se hacen más débiles en presencia de disolventes orgánicos, y su pKa se hace mayor. Este efecto también afecta a los herbicidas ácidos, sus pKa aumentan en presencia de acetona, lo que proporciona su reparto en el disolvente orgánico a partir de la fase acuosa sin necesidad de ajustar previamente el pH. Los herbicidas básicos sufren el efecto contrario, sus pKa disminuyen, se protonan a valores de pH acuoso mucho menores que el valor de pKa de la base, siendo también recuperados [96,97].

El volumen de disolvente fue significativo para los básicos y neutros (28,05%) debido a su volatilidad, sin embargo, no afectó a los ácidos. La recuperación máxima se obtuvo para el nivel C₁, 15 ml, para los básicos y neutros, ya que se concentraba menos volumen de extracto, provocando menores pérdidas de los analitos volátiles, incluso aunque se usase etilenglicol. Sin embargo, el volumen no tenía ningún efecto significativo para los ácidos ya que se llevaban a sequedad en su forma ácida no volátil y sólo se convertían a ésteres o éteres metílicos, muchos más volátiles, antes del análisis. El nivel C₂, 30 ml, se escogió como solución de compromiso entre ambos tipos de analitos. La principal ventaja de la acetona frente al acetato de etilo y el acetonitrilo era su mayor volatilidad, ya que tiene el menor punto de ebullición y, por tanto, minimizaba las pérdidas en la evaporación.

El tiempo de extracción no presentó diferencias significativas entre los niveles estudiados. Se escogió el nivel D₂, 30 min, ya que proporcionaba una respuesta ligeramente superior a 15 min, sin incrementar mucho la duración de la extracción.

La contribución de los errores residuales a la variabilidad de las recuperaciones (4,83% para ácidos y 0,62% para básicos y neutros) indica que el diseño experimental tuvo en cuenta todas las variables que pudieran afectar a la respuesta, los niveles escogidos fueron adecuados y la varianza de los datos experimentales se explicaba por el efecto de los factores y las interacciones.

3.3.3. LIMPIEZA DE MUESTRA

3.3.3.1. Extracción en Fase Sólida (SPE)

Se realizaron dos pruebas con distintos tipos de adsorbentes (detalladas en la Tabla 3.5) que se aplicaron únicamente a los herbicidas Básicos y Neutros.

En la primera se utilizaron cartuchos C18ne (*non-encapped*), que se eluyeron con 5 ml de metanol, acetonitrilo o acetato de etilo. Los cartuchos C18 funcionan por fase reversa a través de sus cadenas de 18 átomos de C, pero también contienen una serie de grupos silanoles en su superficie que en muchas ocasiones no se enmascaran (*non-encapped*) para permitir la existencia de interacciones polares e iónicas secundarias, que aumenta la recuperación de analitos más polares.

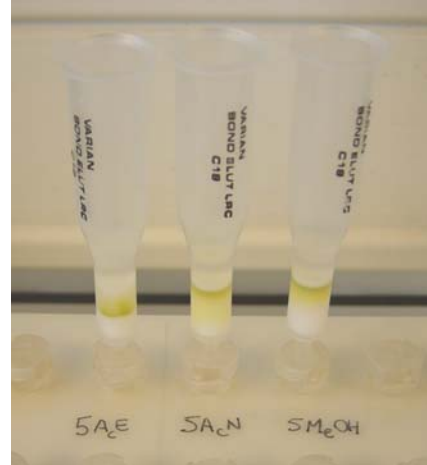


Figura 3.13. Diferentes eluciones de extractos de suelo con cartuchos C18ne.

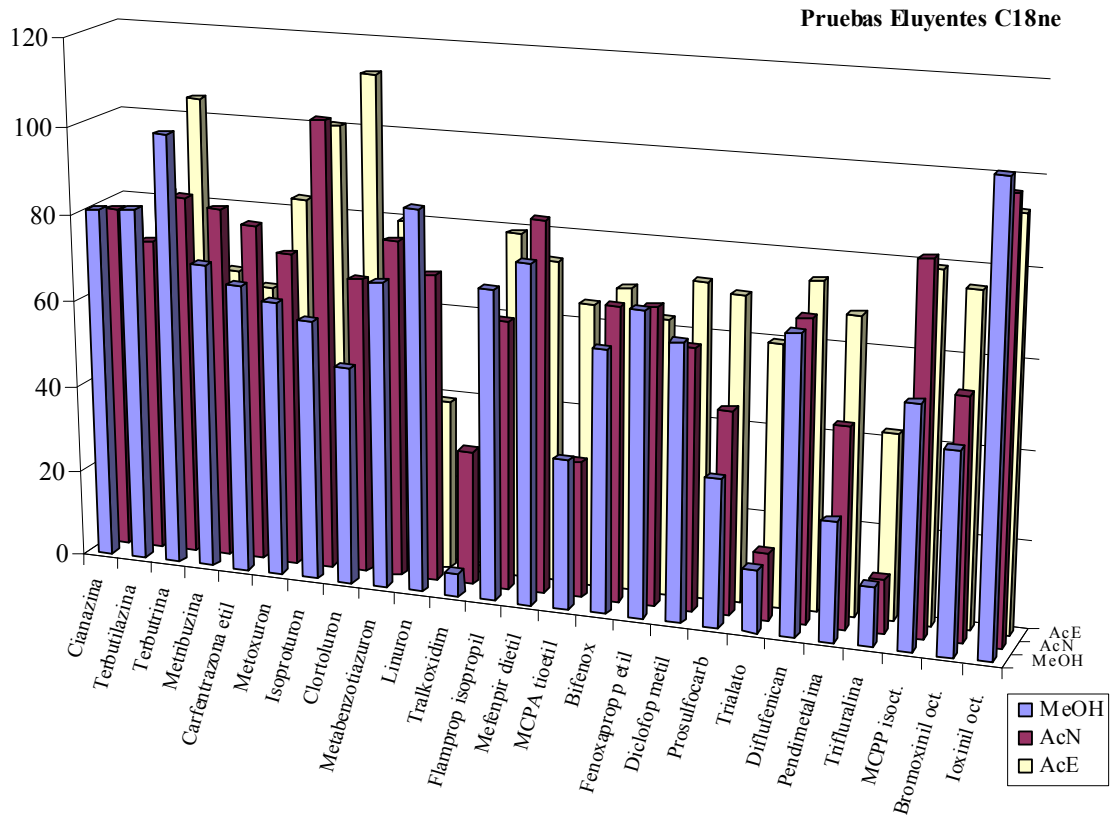


Figura 3.14. Recuperaciones obtenidas al limpiar extractos blancos de suelo contaminados con los herbicidas básicos y neutros (n=3), usando cartuchos C18 ne y eluyendo con tres disolventes diferentes.

Los resultados de esta primera prueba se presentan en la Figura 3.14. El acetato de etilo presentaba recuperaciones algo mayores que los otros dos disolventes, pero también eluía las interferencias de la matriz desde el cartucho (compuestos de color verde en la Figura 3.13, formados principalmente por los ácidos húmicos y fúlvicos de la materia orgánica), los cromatogramas quedaban más sucios y, por tanto, no interesaba usar este disolvente en un paso de limpieza.

En la segunda prueba (Tabla 3.5) se compararon los cartuchos con adsorbente polar, como el Florisil, con los de fase reversa, como el C18ne y un nuevo tipo de cartuchos denominados poliméricos: OASIS-HLB, Strata X, Nexus (Figura 3.15), que se suponían universales. Los resultados de esta segunda prueba se presentan en la Figura 3.16. No se ha representado Florisil debido a sus bajas recuperaciones. Los cartuchos C18ne se eluyeron con 5 ml de metanol y los OASIS-HLB con metanol-éter dietílico, que proporcionaba mejores recuperaciones que el acetonitrilo-isopropanol.

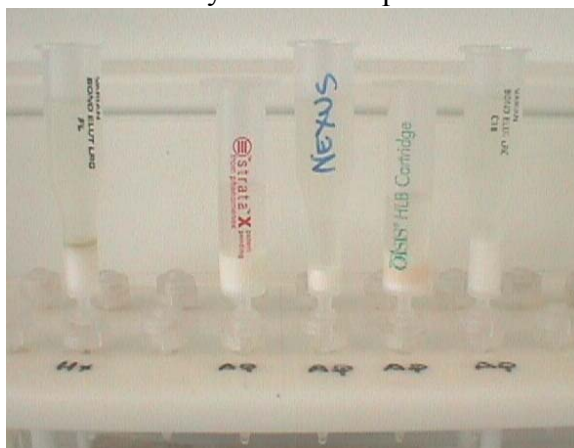


Figura 3.15. Limpieza de extractos de suelo con cartuchos Florisil, Strata X, Nexus, Oasis HLB y C18ne (de izquierda a derecha).

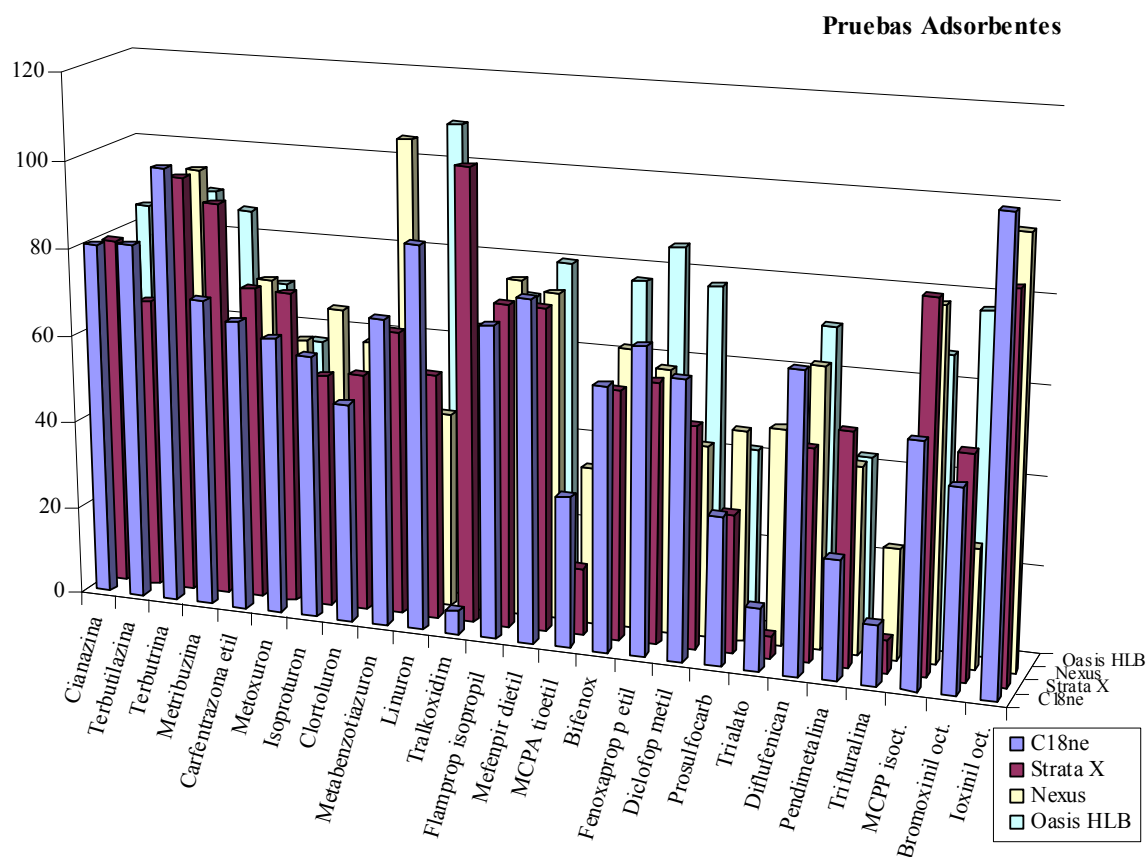


Figura 3.16. Recuperaciones obtenidas al limpiar extractos blancos de suelo contaminados con los herbicidas básicos y neutros (n=3), usando diferentes adsorbentes de SPE.

El Florisil, se cargó con la muestra diluída en hexano, ya que es un cartucho polar y necesita que la muestra sea apolar. Limpia las interferencias polares de la matriz, mientras que deja eluir los analitos apolares. En efecto, las recuperaciones para analitos apolares fueron muy bajas, y no se apreciaron buenas recuperaciones para los analitos más polares. Es por esto, que se decidió el uso de cartuchos apolares, que eran los más adecuados para el tipo de analitos que se querían extraer.

Se comprobó que la recuperación de compuestos apolares mejoraba al dejar un 5% de disolvente orgánico en la muestra acuosa de carga con adsorbentes que funcionaban por fase reversa ya que incrementaba las características de flujo, la penetración y la selectividad del adsorbente, por lo que el ml de extracto obtenido por la extracción de suelo con el método optimizado se diluyó en 19 ml de agua antes de la carga de la muestra en el cartucho (Tabla 3.5).

Los cartuchos poliméricos están formados por un polímero de poliestireno-divinilbenceno altamente entrelazado. Presentan la ventaja de poder usarse con pH más extremos que los de fase reversa con base de sílica, C18, además de que le afecta menos que se quede seco sin que disminuyan las recuperaciones. El polímero del que están formados retiene un amplio espectro de compuestos lipofílicos e hidrofílicos, por lo que se supone que proporciona mejores resultados que C18 para polares y para apolares tiene una recuperación similar. Sin embargo, no se obtuvieron estos resultados, incluso tras probar diferentes disolventes de elución con los cartuchos Oasis HLB.

En general el uso de cartuchos no proporcionó los resultados esperados, porque aunque algunos conseguían limpiar eficazmente las interferencias del extracto de suelo, también las pérdidas de herbicidas eran muy importantes, lo que no permitía recuperarlos adecuadamente de los extractos purificados.

3.3.3.2. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (dSPE)

Hay una serie de inconvenientes en el uso de cartuchos para llevar a cabo los procesos de limpieza:

- las pequeñas áreas de las secciones transversales de los cartuchos de extracción implican lentitud en el proceso de muestreo y baja tolerancia al bloqueo por las partículas y componentes adsorbidos a la matriz,
- los canales que se forman en la matriz adsorbente reducen la capacidad de retención del analito, lo que puede originar una elución prematura del mismo,
- las propiedades del adsorbente son variables entre cartuchos procedentes de distintos lotes y también entre los fabricados por distintas casas comerciales.

Es por esto que se decidió probar la limpieza que proporcionaba la dSPE, en la cual se añadía el adsorbente al extracto llevándose a cabo la limpieza por agitación y centrifugación, eliminando los pasos que presentaban problemas en los cartuchos (Figura 3.17). Los resultados obtenidos con los dos tipos de adsorbentes ensayados se han representado en la Figura 3.18.

El PSA, formado por una amina, retiene los ácidos carboxílicos, por tanto los ácidos grasos, los azúcares y los compuestos que forman enlaces por puentes de hidrógeno, al igual que los fenoxiácidos en su forma aniónica. En una fase acuosa funciona como un intercambiador aniónico débil ya que los grupos NH y NH₂ del adsorbente están protonados y por tanto retiene los analitos con carga negativa. El pH del ml final de elución era de 3,2, donde los herbicidas ácidos se encontraban en forma molecular ya que habían sido recuperados por el diclorometano. Sin embargo, la adición de PSA

aumentaba de 2 a 3 unidades el valor del pH del extracto, por lo que los herbicidas se encontraban en su forma aniónica y pasaban a ser retenidos en el adsorbente.

El GCB, elimina el color, la clorofila, los esteroides, y retiene las estructuras planas. Posee una gran versatilidad en la retención ya que presenta interacciones no específicas (van der Waals) y electrostáticas al ser un adsorbente de intercambio aniónico. Su gran capacidad de retención hace que necesite un modificador que desplace la retención electrostática de los herbicidas ácidos. Pero en algunos casos, disoluciones ácidas son incapaces de desplazar los ácidos húmicos y fúlvicos retenidos al contener muchos grupos funcionales ácidos que interaccionan fuertemente con los sitios activos cargados positivamente de la superficie de GCB [98]. De la misma forma, aunque los herbicidas ácidos estaban en forma molecular en el ml final, quedaron retenidos por la gran capacidad de adsorción del GCB y sus múltiples interacciones. De hecho, presentó peores recuperaciones globales que el PSA.



Figura 3.17. Ejemplos de limpieza de extractos de material vegetal proporcionado por la dSPE.

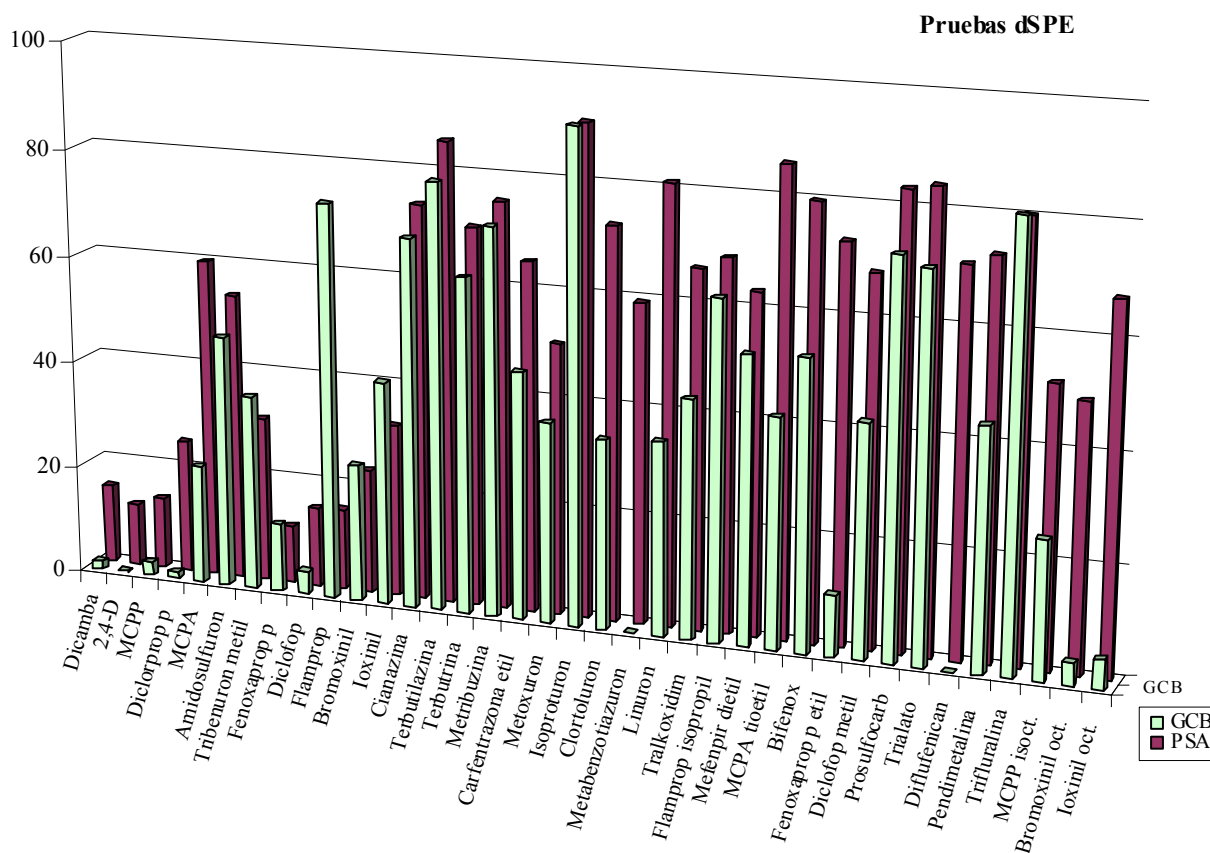


Figura 3.18. Recuperaciones obtenidas al limpiar extractos blancos de suelo contaminados con todos los herbicidas (n=3), usando dos adsorbentes diferentes de dSPE.

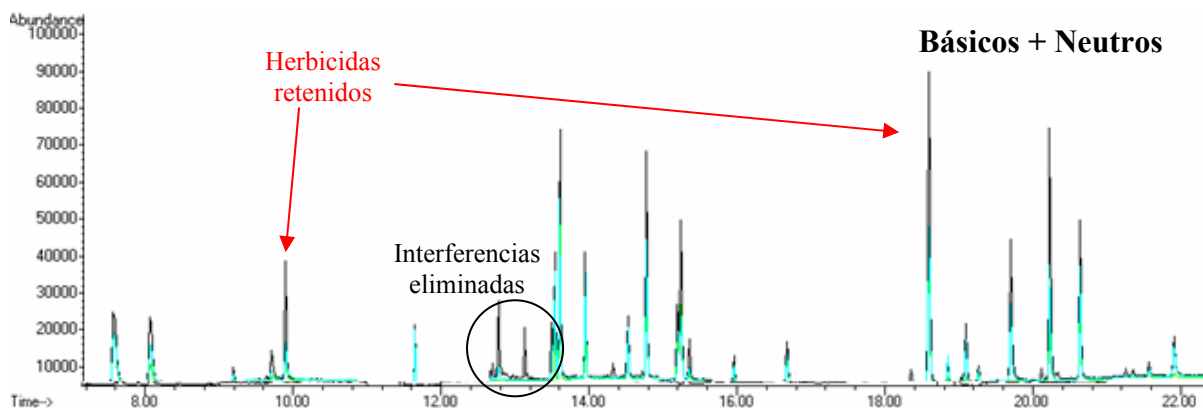


Figura 3.19. Cromatogramas de extractos de suelo a los que se les han añadido los herbicidas básicos y neutros (en negro), comparados con el mismo extracto contaminado al que se le ha aplicado limpieza mediante dSPE con GCB y PSA (en verde).

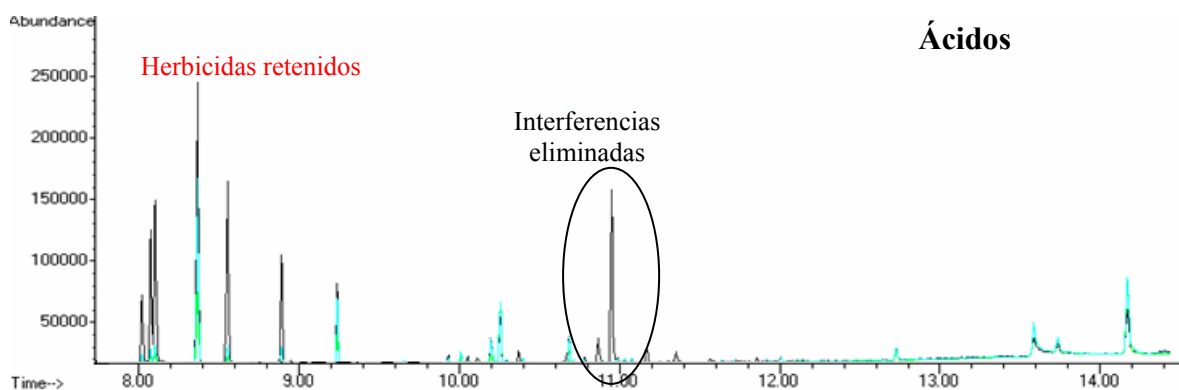


Figura 3.20. Cromatogramas de extractos de suelo a los que se les han añadido los herbicidas ácidos (en negro), comparados con el mismo extracto contaminado al que se le ha aplicado limpieza mediante dSPE con GCB y PSA (en verde).

Debido a que las limpiezas con los adsorbentes en polvo retenían algunos herbicidas (Figuras 3.19 y 3.20) se eliminó este paso, ya que fue imposible encontrar una limpieza universal para el conjunto de herbicidas que se analizaban, ya fuera por SPE o dSPE.

Los procesos de limpieza además de ser tediosos, complicados y necesitar mucho tiempo, suelen estar diseñados para una serie de analitos que tienen las mismas características y no pueden aplicarse para diferentes analitos pertenecientes a distintas familias químicas.

La eliminación de los componentes de la matriz a través de limpiezas exhaustivas de los extractos no es útil en la práctica cuando se desarrollan métodos multirresiduo ya que se determinan herbicidas con un amplio rango de polaridades en matrices muy complejas y no es posible encontrar un método de limpieza universal.

Además, en algunos casos, el aumento en la respuesta producido por la presencia de la matriz proporciona picos cromatográficos de mayor calidad [99]. El reparto con diclorometano, por su parte, también limpia el extracto, sobre todo de interferencias polares.

Como conclusión de la optimización del método de extracción en suelos, se presenta a continuación su diagrama de flujo (Figura 3.21).

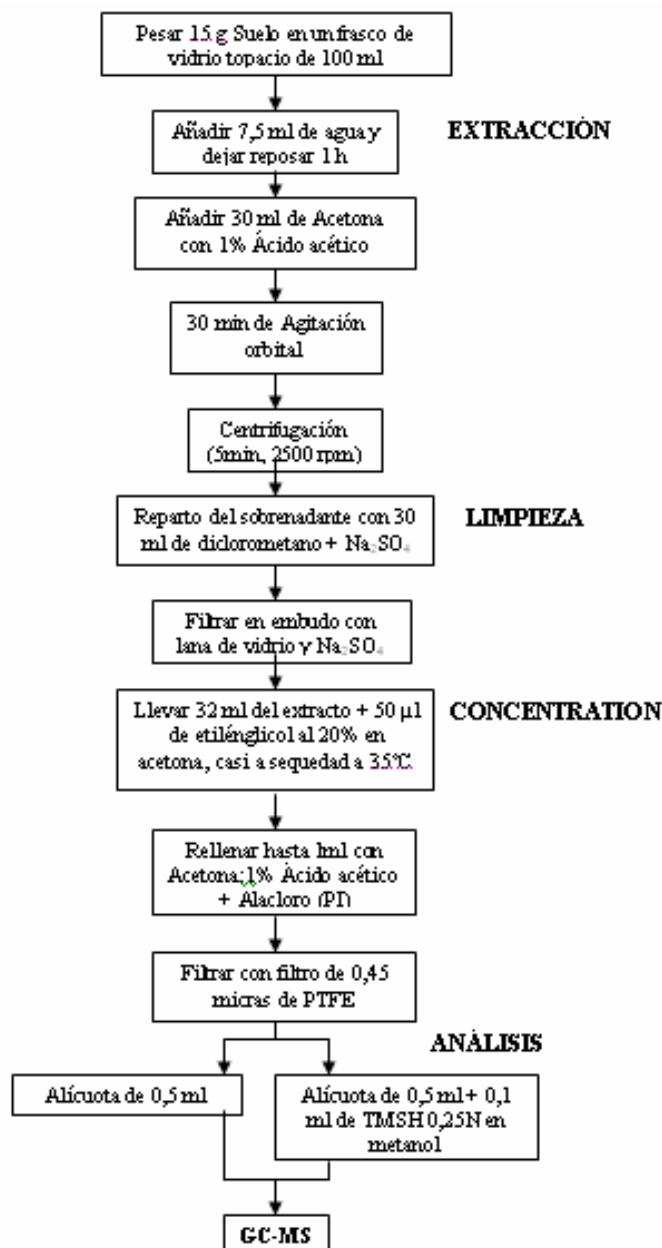


Figura 3.21. Diagrama de flujo del método optimizado de extracción de residuos de herbicidas en muestras de Suelo.

3.3.4. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

Los análisis de residuos requieren, según la Directiva 96/46/CE, métodos multiresiduo, bajos límites, la mejor precisión y exactitud, y una extensa validación.

La Validación del procedimiento optimizado incluye el estudio de la linealidad, los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), la evaluación del efecto matriz, los estudios de recuperación y el cálculo de la incertidumbre, según las recomendaciones europeas [83]. Adicionalmente se han llevado a cabo estudios de robustez.

3.3.4.1. Especificidad/Selectividad

La Especificidad es el grado por el cual un método puede determinar un analito particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla. La Selectividad es la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar [100].

Cada tanda de experimentos se llevó a cabo con un blanco de reactivos para demostrar que todos los equipos y reactivos no introducían interferencias bajo las condiciones de análisis, y una muestra blanca de suelo para estudiar si la presencia de interferencias podía conducir a una falsa identificación, la identificación de los analitos se veía dificultada, o la cuantificación sufría una influencia apreciable.

El uso de un detector MS aseguraba una gran selectividad y especificidad. Se realizó un estudio de solapamiento entre iones de herbicidas adyacentes, comprobándose que no coincidían sus iones característicos y que no sufrían interferencias por parte de la matriz. Se observa en las Figuras 3.19 y 3.20, que la limpieza no era tan necesaria porque la presencia de interferencias en los cromatogramas era escasa.

3.3.4.2. Linealidad

Ya se detalló en el Capítulo 2 la utilidad de los calibrados en matriz, por tanto, la cuantificación de todas las pruebas previas y el método optimizado se realizaron con calibrados preparados sobre extractos blancos de suelo extraídos en las mismas condiciones que las muestras que se iban a cuantificar. Sólo se han representado los coeficientes de los calibrados en matriz preparados a partir de los extractos blancos de suelo extraídos con el procedimiento optimizado debido al gran número de datos obtenidos para todas las pruebas realizadas durante la optimización (Tabla 3.11).

La linealidad del procedimiento de extracción optimizado se estudió con el promedio de 5 repeticiones de calibrados preparados en matriz. Además de las pruebas para la comprobación del ajuste detalladas en el Capítulo 2, también se estudió estadísticamente la falta de ajuste. Para poder usar el modelo de mínimos cuadrados es imprescindible que se cumpla la condición de homocedasticidad, es decir, la varianza que de el modelo debe ser del mismo orden que la residual. Se calculó la “p a posteriori”, medida cuantitativa de la fuerza con la que se rechazaba o aceptaba la hipótesis nula, que consistía en que “la varianza debida a la presunta falta de ajuste era comparable con la varianza experimental estimada a partir de réplicas”, de tal manera que si la “p” era mayor de 0,05, el modelo no tenía falta de ajuste.

Se obtuvieron calibrados lineales para todos los herbicidas en presencia de matriz (suelo) analizados por GC-MS en todo el rango estudiado (0,01-0,5 mg/l) a seis niveles. Los resultados se presentan en la Tabla 3.11.

3.3.4.3. Límites de Detección y Cuantificación

El LD se calculó según lo expuesto en el Capítulo 2, para los calibrados en matriz preparados a partir de los extractos blancos de suelo extraídos con el procedimiento optimizado, ya que se había demostrado que los calibrados en matriz cumplían la condición de homocedasticidad, (p posteriori $> 0,05$), y de esta forma se incluía el efecto matriz en el cálculo del límite.

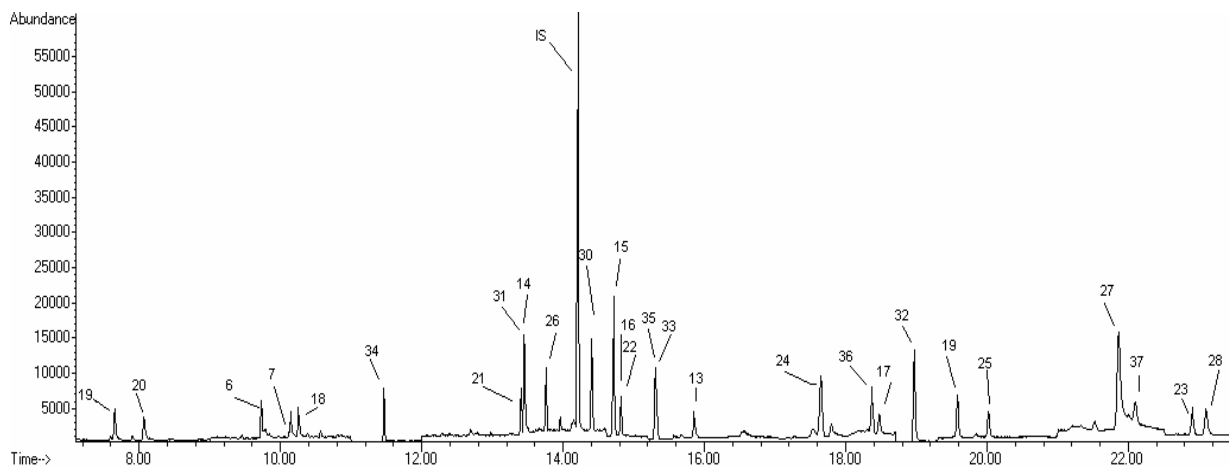


Figura 3.22. Cromatograma de un blanco de suelo contaminado con los herbicidas Básicos y Neutros a nivel del LC, extraído con el procedimiento optimizado y analizados por GC-MS. Los picos están numerados como en las Tabla 3.11. IS, Patrón interno – Alacloro.

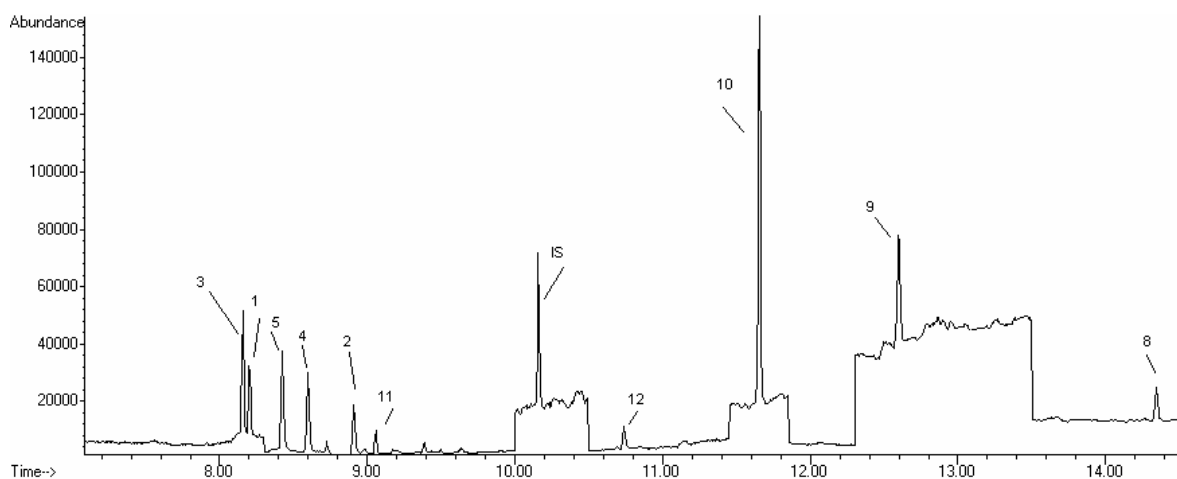


Figura 3.23. Cromatograma de un blanco de suelo contaminado con los herbicidas Ácidos a nivel del LC, extraído con el procedimiento optimizado y derivatizado con TMSH a sus esters/éteres metílicos previamente a su análisis por GC-MS. Los picos están numerados como en las Tabla 3.11. IS, Patrón interno – Alacloro.

El LC es el nivel al cual la precisión de la medida será satisfactoria para la determinación cuantitativa. Es decir, es la concentración más baja de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de repetibilidad, precisión y exactitud (Directiva 96/46/CE). Se estima de la misma manera que el LD, pero la k toma un valor de 10.

Los criterios de repetibilidad, precisión y exactitud vienen fijados por la norma europea, actualizada a través de los años [83]. El Documento N° SANCO/10232/2003 permitía recuperaciones entre 60-120% para los niveles de concentración de 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y de 70-120% para los de 10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo posteriormente actualizados a 70-110% para todas las concentraciones por medio del Documento N° SANCO/10232/2006. El coeficiente de variación debía ser menor o igual al 15-20-30% en función de la concentración. Para su comprobación, se contaminaron muestras blanco de suelo con el LC de los herbicidas (Figuras 3.22 y 3.23). Los resultados se presentan en la Tabla 3.11.

Ambos límites se calcularon en función del factor de dilución de las muestras, es decir, el ml final de extracto en el método optimizado contenía el equivalente a 8 g de suelo, que se comprobó eran suficientes para que los LC fueran aceptables, ya que estaban por debajo del límite de determinación propuesto en suelo (0,05 mg/kg) por la Directiva 91/414/CEE.

Tabla 3.11. Condiciones de linealidad, LD, LC y efecto matriz (mediante el test del ajuste lineal) de calibrados de preparados en extractos blancos de suelo.

Nº	Compuesto	p	Cf. Lin.	% CVfr	LD (ug/kg)	LC (ug/kg)	Ajuste Lineal	
							b	±t*Sb
1	Dicamba	0,66	96,7	5,2	2,39	7,26	2,14	0,03
2	2,4-D	0,10	95,2	8,9	4,09	12,44	2,96	0,32
3	MCPP	0,54	96,1	8,7	4,28	13,00	2,43	0,10
4	Diclorprop p	0,52	95,7	6,8	0,99	3,02	2,77	0,12
5	MCPA	0,35	95,9	12,8	4,00	12,17	2,72	0,08
6	Amidosulfuron	0,25	95,1	12,5	7,79	23,69	1,70	0,13
7	Tribenuron metil	0,44	96,2	13,6	9,07	27,56	1,22	0,12
8	Fenoxaprop p	0,35	96,0	9,5	4,73	14,38	5,38	0,50
9	Diclofop	0,77	96,5	5,9	4,19	12,75	2,01	0,09
10	Flamprop	0,94	95,1	12,6	2,71	8,25	2,48	0,10
11	Bromoxinil	0,16	95,1	10,0	2,81	8,55	3,20	0,22
12	Ioxynil	0,56	95,1	5,9	4,55	13,84	3,11	0,31
13	Cianazina	0,72	95,9	11,2	3,34	10,15	0,78	0,05
14	Terbutilazina	0,08	96,4	6,9	4,21	12,79	1,21	0,04
15	Terbutrina	0,85	96,5	7,8	4,16	12,64	1,22	0,03
16	Metribuzina	0,63	95,7	11,3	6,43	19,53	1,29	0,05
17	Carfentrazona etil	0,06	96,6	12,7	5,34	16,23	1,27	0,01
18	Metoxuron	0,06	96,0	9,7	7,76	23,60	0,72	0,02
19	Isoproturon	1,00	96,4	7,7	3,86	11,73	0,77	0,03
20	Clortoluron	0,05	95,8	8,5	3,55	10,80	0,72	0,02
21	Metabenzotiazuron	0,05	95,6	11,8	6,98	21,23	1,47	0,10
22	Linuron	0,60	97,7	10,4	4,45	13,54	2,56	0,33
23	Tralkoxidim	0,94	95,2	10,2	7,16	21,76	0,75	0,06
24	Flamprop isopropil	0,88	97,1	7,8	5,67	17,22	1,25	0,06
25	Mefenpir dietil	0,14	96,4	8,7	5,97	18,14	1,38	0,03
26	MCPA tioetil	0,24	96,5	7,6	5,07	15,41	1,35	0,05
27	Bifenox	0,36	96,0	13,8	6,08	18,49	1,59	0,05
28	Fenoxaprop p etil	0,57	95,8	7,9	6,10	18,55	1,55	0,03
29	Diclofop metil	0,37	96,7	6,3	6,63	20,15	1,26	0,06
30	Prosulfocarb	0,20	96,6	5,4	5,15	15,66	1,24	0,05
31	Triallato	0,05	96,9	7,3	5,44	16,54	1,28	0,04
32	Diflufenican	0,36	96,5	8,1	6,69	20,35	1,42	0,09
33	Pendimetalina	0,42	95,1	12,8	5,10	15,50	1,40	0,02
34	Trifluralina	0,41	95,8	8,3	5,24	15,94	1,44	0,06
35	MCPP isooctílico	0,61	96,5	11,4	6,15	18,68	1,29	0,07
36	Bromoxinil octanoato	0,53	96,2	8,4	5,75	17,48	1,33	0,06
37	Ioxinil octanoato	0,06	95,9	14,0	7,93	24,10	1,17	0,12
Criterios		>0,05	> 95	< 15			< 50	

b representa la pendiente y Sb su desviación.

Valores de t calculados a $\alpha=0,05$ y 4 grados de libertad, $t = 2,776$.

3.3.4.4. Evaluación del Efecto Matriz

La presencia o ausencia de efecto matriz se demostró comparando la respuesta producida por el analito en acetona acidificada con 1% de ácido acético, con la obtenida a partir de la misma cantidad de analito en presencia del extracto blanco de suelo extraído con el método optimizado y contaminado a los mismos niveles. Se aplicó el test de ajuste a una línea, ya que era el más restrictivo, ya detallado en el Capítulo 2.

Todos los analitos extraídos con el procedimiento optimizado presentaron efecto matriz, aunque incluían el reparto con diclorometano que eliminaba interferencias polares. Por tanto, todos se cuantificaron con calibrados en matriz para evitar una cuantificación incorrecta, lo que estaba de acuerdo con las recomendaciones de la UE [83]. Los resultados del ajuste lineal se presentan en la Tabla 3.11 únicamente para la pendiente (b) y su intervalo de confianza (t^*S_b), debido al gran número de datos.

3.3.4.5. Exactitud (Recuperación) y Precisión

Los estudios de **Recuperación** se realizaron a 4 concentraciones diferentes, con el objetivo de cubrir las cantidades de residuos de herbicidas presentes en las muestras reales: 25, 50, 150 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, es decir a 0,5, 1, 3 y 5 veces el límite de determinación recomendado en suelos por la Directiva 91/414/CEE.

Debido a que no se encontraron materiales de referencia certificados en suelos, las muestras usadas para los estudios de recuperación se prepararon en el laboratorio a partir de blancos de suelo que se contaminaban con concentraciones conocidas de los herbicidas, con el método ya descrito que permitía simular muestras con residuos envejecidos.

Las medias de las recuperaciones de 5 repeticiones se muestran en la Tabla 3.12. Las recuperaciones de los herbicidas a todos los niveles estuvieron en el rango de 70-120%, para los criterios de SANCO/10476/2003 y 70-110% para el SANCO/10232/2006 [83]. Las diferencias debidas a las concentraciones de los analitos entre los distintos niveles fueron mínimas respecto de la recuperación y se obtuvieron valores adecuados de precisión, es decir, $CV < 20\%$ para los dos niveles menos concentrados, y $CV < 15\%$ para los niveles más concentrados [83]. La linealidad de la extracción se comprobó calculando los coeficientes de linealidad en el rango extraído (25-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$), comprobándose que todos los analitos tenían una adecuada linealidad en la extracción, a excepción del Trialato para el que era ligeramente inferior al 95% (subrayándose su valor en la Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Coeficientes de linealidad de la extracción, recuperaciones y coeficientes de variación para la 1ª y 2ª extracción (sucesiva) a los 4 niveles de contaminación en muestras de suelo blanco extraídas con el método optimizado. Estudio de la necesidad de cuantificar con el método de adiciones patrón (*b* y *t*Sb*).

Nº	Herbicida	%TR 25 ppb	%CV (n=5)	%TR 50 ppb	%CV (n=5)	2ª %TR 50 ppb	%CV (n=5)	%TR 150 ppb	%CV (n=5)	2ª %TR 150 ppb	%CV (n=5)	%TR 250 ppb	%CV (n=5)	2ª %TR 250 ppb	%CV (n=5)	Coef. Lineal.	b	±t*Sb
1	Dicamba	105,78	8,10	86,96	2,37	6,22	5,56	91,72	2,75	8,30	9,94	92,86	3,29	9,26	14,36	98,0	0,92	0,08
2	2,4-D	86,62	7,00	91,19	3,10	5,51	9,88	90,54	1,73	7,25	14,00	88,51	3,45	7,50	8,93	97,4	0,90	0,10
3	MCP	92,86	5,32	97,97	4,64	6,09	9,92	97,14	2,65	5,11	10,22	95,04	4,77	6,02	16,88	98,8	0,95	0,05
4	Diclorprop p	103,67	5,89	101,10	2,98	5,14	11,69	102,23	0,36	6,48	10,85	96,98	4,35	6,52	8,32	97,6	0,97	0,10
5	MCPA	85,98	5,61	95,85	3,70	0,28	11,52	89,96	2,42	3,18	9,05	92,90	3,18	5,37	7,74	98,1	0,93	0,07
6	Amidosulfuron	71,67	7,43	88,83	4,87	3,87	16,65	78,28	8,24	7,13	9,77	85,37	3,78	0,55	7,98	95,6	0,85	0,16
7	Tribenuron metil	88,29	2,43	101,81	4,95	2,03	9,26	98,62	1,68	1,43	2,67	104,67	3,40	2,20	7,52	97,4	1,05	0,12
8	Fenoxaprop p	75,40	6,21	81,24	3,94	5,49	9,55	84,26	3,38	7,51	7,41	84,64	4,26	8,31	8,51	96,9	0,88	0,12
9	Diclofop	88,25	3,94	100,43	4,65	4,93	9,03	100,95	3,02	6,83	15,89	101,93	4,30	6,99	5,81	99,3	1,03	0,03
10	Flamprop	103,55	3,55	98,85	2,00	4,54	7,38	101,93	4,30	8,22	7,68	102,08	2,73	8,79	9,08	99,4	1,02	0,02
11	Bromoxinil	96,04	5,19	98,47	4,01	0,78	12,10	96,13	2,68	4,19	4,61	99,88	2,18	5,47	10,36	98,2	1,00	0,08
12	Ioxinil	99,18	1,97	98,38	7,16	1,39	14,75	99,91	3,36	5,40	6,49	96,92	3,13	7,02	9,73	98,6	0,97	0,06
13	Cianazina	95,08	5,80	100,58	5,86	13,11	6,72	100,34	2,89	12,22	6,25	108,81	1,19	13,48	7,27	96,6	1,09	0,16
14	Terbutilazina	89,49	5,06	103,74	2,39	1,82	4,25	105,04	3,97	3,33	3,04	106,18	1,54	5,19	5,44	98,1	1,09	0,09
15	Terbutrina	88,62	4,36	96,69	4,79	3,14	12,94	96,44	0,95	5,94	2,63	98,05	1,18	6,78	10,67	99,3	0,99	0,03
16	Metribuzina	88,38	2,58	95,04	4,12	4,29	15,71	98,70	2,96	6,89	2,78	104,58	4,16	8,11	12,38	97,8	1,06	0,10
17	Carfentrazona etil	94,17	2,52	91,94	0,83	5,70	2,50	92,15	4,77	3,90	2,00	100,60	1,86	5,70	2,90	96,2	1,01	0,17
18	Metoxuron	85,34	5,94	97,83	2,40	3,24	10,35	95,30	3,57	1,27	12,95	99,09	7,33	1,15	10,01	98,2	1,00	0,08
19	Isoproturon	93,76	5,61	103,09	5,42	1,53	13,20	93,00	3,20	3,55	9,84	102,66	4,31	4,16	16,05	95,3	1,02	0,21
20	Clortoluron	94,46	4,84	102,83	6,05	0,43	9,09	97,28	1,16	1,55	14,56	103,57	5,41	1,70	21,35	97,1	1,03	0,13
21	Metabenzotiazuron	77,16	6,56	95,46	3,03	3,23	3,00	97,31	4,62	5,99	5,80	102,73	6,04	5,62	19,89	98,0	1,05	0,09
22	Linuron	90,81	5,89	96,97	2,01	3,00	9,30	94,40	6,39	5,80	4,10	102,55	7,33	4,90	2,10	96,4	1,03	0,16
23	Tralkoxidim	91,78	1,65	91,79	5,49	0,63	13,45	89,51	11,11	1,83	8,29	95,22	2,65	1,48	8,61	97,2	0,95	0,12
24	Flamprop isopropil	100,92	4,48	98,83	3,09	2,01	15,81	98,58	3,68	5,05	3,88	103,18	4,96	6,59	10,97	97,9	1,03	0,09
25	Mefenpir dietil	102,78	6,06	96,24	5,84	2,19	8,70	102,64	2,55	5,43	4,11	103,52	4,44	6,45	10,19	99,0	1,04	0,04
26	MCPA tioetil	90,02	2,45	98,05	3,38	0,83	4,02	103,53	5,50	2,73	1,27	104,48	1,88	5,00	14,26	98,2	1,08	0,09
27	Bifenox	102,30	2,10	100,93	1,17	5,61	9,17	99,65	2,10	6,18	9,65	105,30	0,57	6,75	4,28	97,5	1,05	0,11
28	Fenoxaprop p etil	90,91	4,51	91,02	2,18	2,57	17,72	95,55	3,93	6,07	3,33	103,71	1,40	7,14	7,07	96,7	1,05	0,15
29	Diclofop metil	101,66	0,63	94,07	5,08	1,61	12,20	97,01	4,11	6,05	10,94	106,77	4,46	6,69	9,87	95,7	1,07	0,20
30	Prosulfocarb	87,76	3,65	97,81	3,44	2,71	3,70	100,97	5,78	3,44	3,21	105,64	1,19	5,08	8,90	98,4	1,07	0,07
31	Trialato	103,41	2,56	90,55	4,18	2,30	2,32	92,61	1,67	3,58	4,98	106,15	0,87	5,09	13,89	93,9	1,06	0,28
32	Diflufenican	108,48	6,37	102,60	2,19	2,87	16,01	103,60	3,75	5,26	5,32	106,42	4,93	6,23	12,41	98,6	1,06	0,06
33	Pendimetalina	97,47	2,58	89,19	3,20	3,38	14,16	91,98	5,04	4,55	9,35	94,30	2,20	5,79	12,90	98,5	0,94	0,06
34	Trifluralina	82,52	4,83	90,08	7,90	1,52	15,04	95,55	2,69	3,48	5,23	107,97	1,62	4,88	7,64	95,3	1,10	0,22
35	MCPA isoocético	98,39	1,93	93,43	3,26	4,76	1,81	100,00	5,69	4,35	7,18	104,31	3,58	5,89	9,84	98,1	1,05	0,09
36	Bromoxinil oct.	99,38	2,57	93,65	4,18	1,99	17,25	94,28	3,01	4,69	4,12	96,24	4,92	5,93	8,46	98,9	0,96	0,05
37	Ioxinil octanoato	96,46	6,08	92,82	2,40	4,22	15,89	93,24	4,85	6,94	0,77	101,10	6,88	6,53	6,63	96,4	1,01	0,16
Criterios		70-120	<20	70-120	<20			70-110	<15			70-110	<15			>95		

Se realizó una prueba de una segunda extracción sobre el residuo de suelo ya extraído repitiendo todo el método optimizado. Se demostró que la primera extracción recuperaba adecuadamente los herbicidas, ya que las recuperaciones encontradas en la segunda extracción eran, en general, menores del 10%, para los niveles de concentración de 25, 50, 150 y 250 µg/kg.

Tabla 3.13. Valores de la precisión combinada para los cuatro niveles a los que se estudió la recuperación y precisión.

Nº	Herbicida	CV total (25ppb)	CV total (50ppb)	CV total (150ppb)	CV total (250ppb)
1	Dicamba	12,15	7,15	5,64	3,75
2	2,4-D	10,50	6,40	8,44	8,56
3	MCPP	7,98	6,74	6,91	8,67
4	Diclorprop p	8,84	4,84	8,15	3,87
5	MCPA	8,42	8,38	2,50	5,06
6	Amidosulfuron	11,15	11,26	9,29	6,34
7	Tribenuron metil	3,65	14,00	3,07	5,23
8	Fenoxaprop p	9,32	6,95	5,11	5,87
9	Diclofop	5,91	7,66	6,13	4,63
10	Flamprop	5,33	3,38	9,65	5,32
11	Bromoxinil	7,79	9,28	3,32	7,70
12	Ioxinil	2,96	6,38	6,85	8,26
13	Cianazina	8,70	6,78	3,41	7,24
14	Terbutilazina	7,59	9,80	6,33	5,13
15	Terbutrina	6,54	7,26	5,71	2,73
16	Metribuzina	3,87	5,30	8,84	3,85
17	Carfentrazona etil	3,78	4,46	7,96	4,17
18	Metoxuron	8,91	4,25	12,30	9,94
19	Isoproturon	8,42	5,70	6,95	4,16
20	Clortoluron	7,26	8,47	9,81	7,09
21	Metabenzotiazuron	9,84	5,04	7,20	7,27
22	Linuron	8,84	5,59	6,76	7,47
23	Tralkoxidim	2,48	6,57	10,76	3,95
24	Flamprop isopropil	6,72	9,30	7,71	5,37
25	Mefenpir dietil	9,09	9,91	8,55	4,26
26	MCPA tioetil	3,68	3,99	10,03	3,61
27	Bifenox	3,15	2,67	3,19	4,76
28	Fenoxaprop p etil	6,77	8,43	7,77	4,63
29	Diclofop metil	0,95	7,54	7,54	12,59
30	Prosulfocarb	5,48	7,71	9,71	3,33
31	Triallato	3,84	4,49	6,10	2,92
32	Diflufenican	9,56	9,56	6,07	5,15
33	Pendimetalina	3,87	9,42	8,36	3,21
34	Trifluralina	7,25	8,09	5,90	12,74
35	MCPP isooctílico	2,90	4,63	7,36	4,44
36	Bromoxinil octanoato	3,86	8,96	4,87	4,57
37	Ioxinil octanoato	9,12	6,60	4,32	6,67
	Crterios	<22-32	<22	<14	<14

Con los datos obtenidos en las recuperaciones, se realizaron varias pruebas para comprobar si el uso del calibrado en matriz para cuantificar era adecuado o no, o era necesario utilizar el método de adiciones patrón. Por una parte, se representó la concentración obtenida frente a la añadida. Al hacer la regresión por el método de mínimos cuadrados se obtuvo una línea recta cuya ordenada en el origen incluía el valor de cero y cuya pendiente incluía el valor de uno (únicos valores que se presentan en la Tabla 3.12), es decir, no existía un error sistemático debido a la matriz, lo que demostraba que el uso del calibrado en matriz era adecuado y no hacía falta usar el método de adiciones patrón.

Se realizó la **Precisión** para los cuatro niveles en que se habían hecho los estudios de recuperación, en condiciones de repetibilidad (Tabla 3.12) y en condiciones de precisión intermedia (Tabla 3.13), es decir, variando los lotes de los reactivos y los días de análisis en el mismo laboratorio. Con estos valores se calculó la precisión combinada, según la expresión:

$$S \text{ total} = (S^2 \text{ repet} / n + S^2 \text{ reprod})^{1/2}$$

donde “n” es el número de repeticiones [100].

Los valores encontrados de la precisión combinada (Tabla 3.13) cumplieron los criterios europeos [83].

3.3.4.6. Robustez

Según la Directiva 95/36/CE, los suelos para los estudios de robustez deberán seleccionarse de manera que constituyan una muestra representativa de la gama de suelos típica de las regiones en las que se utiliza o piensa utilizarse el producto fitosanitario.

La interacción de los herbicidas con la matriz del suelo es más fuerte que con el agua o los alimentos. Los procedimientos de extracción deben ser capaces de liberar las fracciones enlazadas al suelo, y normalmente requieren mayor tiempo de contacto con el disolvente, o un incremento de éste mediante la agitación, los ultrasonidos, la presión o la temperatura. Además depende mucho del tipo de matriz, de tal manera que los suelos con mayor contenido en materia orgánica o arcillas son más difíciles de extraer y sus recuperaciones disminuyen [101].

La robustez de un método analítico es la resistencia a los cambios cuando se producen desviaciones mínimas de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento. Debido a que ya se introdujeron cambios en los reactivos y días en las pruebas de la precisión, se tomaron suelos agrícolas representativos con diferentes características para comprobar si el pH que proporcionaba la mezcla de disolventes optimizada era también útil en esas condiciones, teniendo en cuenta que el pH de los suelos agrícolas suele estar entre 5,5 y 7,5 [18,102].

El Suelo 1 es el utilizado en las experiencias previas y en el diseño ortogonal. El Suelo 2 contenía más arcilla comparado con los Suelos 1 y 4. El Suelo 3 se seleccionó porque tenía el contenido más alto en arcilla y materia orgánica de los cuatro, además del pH más ácido. El Suelo 4 se usó como control ya que estaba principalmente compuesto por arena.

Tabla 3.14. Coeficientes de linealidad (Coef.L) (calibrados en matriz), recuperaciones (TR%) e incertidumbres relativas (Irel) para los cuatro tipos de suelos diferentes contaminados a 50 µg kg⁻¹ y extraídos con el procedimiento optimizado. Las medias seguidas por letras diferentes en la misma fila tienen diferencias significativas a un nivel de p < 0,05 según el test de Tukey para el mismo número de réplicas.

Características del Suelo		Suelo 1		Suelo 2		Suelo 3		Suelo 4	
1	% Materia Orgánica	0,69		1,66		> 2,50		0,905	
2	% Arcilla	17,00		63,00		60,00		2,00	
3	% Limo	37,00		3,00		24,00		3,00	
4	% Arena	46,00		34,00		15,60		95,00	
5	CIC (meq/100g)	9,20		15,90		5,26		5,30	
6	pH Suelo	8,50		8,20		6,00		8,04	
7	pH (Suelo+Disolvente)	5,20		5,19		3,92		5,04	
Nº	Herbicida	Coef. L	TR% ± I rel	Coef. L	TR% ± I rel	Coef. L	TR% ± I rel	Coef. L	TR% ± I rel
1	Dicamba	99,3	86,96c ± 7,03	99,3	84,70c ± 6,85	98,8	103,79a ± 8,39	99,3	94,54b ± 7,64
2	2,4-D	96,7	91,19ab ± 7,42	98,5	79,75b ± 6,48	98,3	99,33a ± 8,08	98,4	86,85b ± 7,06
3	MCPP	98,8	97,97a ± 7,51	99,1	104,88a ± 8,04	99,5	104,79a ± 8,03	99,2	106,51a ± 8,16
4	Diclorprop p	98,8	101,10ab ± 6,93	99,0	96,32b ± 6,61	98,8	107,26a ± 7,36	98,9	103,43ab ± 7,09
5	MCPA	98,5	95,85b ± 6,35	99,0	79,11c ± 5,24	98,7	107,53a ± 7,12	99,5	104,64ab ± 6,93
6	Amidosulfuron	98,4	88,83bc ± 9,02	98,5	83,67c ± 8,50	99,1	85,87c ± 8,72	99,2	100,40a ± 10,20
7	Tribenuron metil	96,2	101,81a ± 7,97	97,5	103,55a ± 8,10	99,6	103,28a ± 8,08	99,5	101,94a ± 7,98
8	Fenoxaprop p	99,5	81,24a ± 5,88	98,5	77,07a ± 5,58	98,5	82,47a ± 5,97	99,4	84,57a ± 6,12
9	Diclofop	98,6	100,43a ± 7,20	99,0	107,37a ± 7,70	98,9	104,26a ± 7,47	99,7	106,65a ± 7,65
10	Flamprop	98,6	98,85a ± 5,93	98,4	91,51a ± 5,49	98,7	100,43a ± 6,03	99,1	99,21a ± 5,96
11	Bromoxinil	96,6	98,47a ± 6,64	98,3	104,92a ± 7,07	98,9	106,18a ± 7,16	99,0	99,39a ± 6,70
12	Ioxinil	99,1	98,38a ± 9,52	98,1	108,74a ± 10,52	98,3	106,41a ± 10,29	99,0	105,26a ± 10,18
13	Cianazina	98,4	100,58a ± 8,82	98,9	106,35a ± 9,33	99,1	105,80a ± 9,28	99,5	103,67a ± 9,09
14	Terbutilazina	98,3	103,74a ± 6,36	98,5	103,97a ± 6,37	99,0	104,63a ± 6,41	99,1	105,94a ± 6,49
15	Terbutrina	97,9	96,69a ± 7,60	99,0	102,51a ± 8,05	99,4	97,38a ± 7,65	99,7	100,42a ± 7,89
16	Metribuzina	96,8	95,04a ± 6,60	98,5	103,06a ± 7,16	98,8	99,76a ± 6,93	99,3	103,98a ± 7,22
17	Carfentrazona etil	97,0	91,94b ± 5,97	97,6	102,51a ± 6,66	98,6	106,41a ± 6,91	99,1	99,02ab ± 6,43
18	Metoxuron	99,3	97,83a ± 8,59	98,6	93,39a ± 8,20	99,0	106,44a ± 9,35	99,4	102,36a ± 8,99
19	Isoproturon	99,0	103,09a ± 8,45	99,8	94,74a ± 7,77	98,5	103,38a ± 8,47	99,1	93,64a ± 7,68
20	Clortoluron	99,2	102,83a ± 8,69	98,8	96,73a ± 8,17	98,3	98,38a ± 8,31	98,9	99,77a ± 8,43
21	Metabenzotiazuron	97,8	95,46ab ± 7,30	97,3	89,32b ± 6,83	98,7	103,39a ± 7,91	99,1	96,46ab ± 7,38
22	Linuron	97,4	96,97ab ± 8,67	98,4	92,65b ± 8,28	98,3	90,32b ± 8,07	98,1	103,80a ± 9,28

23	Tralkoxidim	98,4	91,79b ± 12,09	98,8	99,39b ± 13,09	98,5	97,48b ± 12,84	99,4	108,06a ± 14,23
24	Flamprop isopropil	98,6	98,83ab ± 6,03	97,3	90,21b ± 5,51	99,3	103,85a ± 6,34	99,6	100,39ab ± 6,13
25	Mefenpir dietil	97,5	96,24bc ± 7,94	97,7	90,40c ± 7,46	99,2	105,60ab ± 8,72	99,7	103,72ab ± 8,56
26	MCPA tioetil	98,4	98,05bc ± 6,62	99,1	105,10ab ± 7,10	99,2	108,07a ± 7,30	99,4	95,31c ± 6,44
27	Bifenox	96,5	100,93ab ± 5,17	96,9	91,92c ± 4,71	97,2	107,45a ± 5,50	98,8	96,72bc ± 4,95
28	Fenoxaprop p etil	97,1	91,02b ± 5,53	98,0	97,04ab ± 5,89	98,8	96,87ab ± 5,88	99,4	99,84a ± 6,06
29	Diclofop metil	98,0	94,07b ± 7,08	98,8	103,98a ± 7,83	99,3	101,70ab ± 7,65	99,7	103,69a ± 7,80
30	Prosulfocarb	98,0	97,81a ± 6,71	98,7	104,47a ± 7,17	99,3	102,82a ± 7,06	99,6	100,19a ± 6,88
31	Trialato	98,0	90,55a ± 6,21	99,3	96,02a ± 6,59	99,3	95,72a ± 6,57	99,4	96,82a ± 6,64
32	Diflufenican	97,6	102,60a ± 7,19	98,4	104,88a ± 7,35	99,2	106,19a ± 7,45	99,7	102,28a ± 7,17
33	Pendimetalina	96,5	89,19b ± 5,61	96,8	97,77ab ± 6,15	97,2	100,14a ± 6,30	99,1	97,99ab ± 6,16
34	Trifluralina	97,2	90,08a ± 9,37	98,0	88,00a ± 9,15	98,1	90,30a ± 9,39	99,0	87,56a ± 9,10
35	MCPP isooctílico	98,2	93,43b ± 6,75	98,7	106,28a ± 7,68	99,3	103,38a ± 7,47	99,6	104,49a ± 7,55
36	Bromoxinil octanoato	97,5	93,65b ± 6,32	98,1	105,02a ± 7,09	99,0	103,39a ± 6,98	99,5	104,51a ± 7,06
37	Ioxinil octanoato	96,7	92,82a ± 7,87	96,3	89,69a ± 7,61	98,0	96,60a ± 8,19	98,1	99,90a ± 8,47

Se prepararon calibrados en matriz con los 4 suelos diferentes para comprobar la linealidad. Todos los analitos mostraron buenos coeficientes de linealidad en el rango (0,01-0,5 mg/l) estudiado a seis niveles. Por tanto, se demuestra que la cuantificación con calibrados en matriz preparados a partir de diferentes suelos es adecuada.

Se calculó también el efecto matriz para los suelos de las pruebas de robustez, comprobándose que todos los herbicidas estaban afectados por él. No se han representado estos valores en la Tabla 3.14 debido al gran número de datos.

Además, se contaminaron a un nivel de 0,05 mg/kg y se extrajeron con el procedimiento optimizado. El promedio de las 5 réplicas se ha representado en la Tabla 3.14. Las medias en la misma fila seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes a $p < 0,05$, según el test de Tukey para el mismo número de réplicas. Se encontró que para 19 herbicidas de los 37 estudiados, sus recuperaciones eran independientes del tipo de suelo. Las mayores recuperaciones de herbicidas ácidos se obtuvieron para el Suelo 3, debido a su pH más ácido. El contenido alto en arcilla y materia orgánica no disminuyó la eficiencia en las recuperaciones de los analitos, como se esperaba [15]. Los analitos básicos no se vieron afectados por el tipo de suelo. La adsorción de los neutros se suponía afectada por el contenido en materia orgánica, pero este efecto tampoco se observó [15].

Como conclusión, el método optimizado ha demostrado ser eficiente y robusto para distintos tipos de suelos que cubren el rango de los suelos agrícolas que pueden encontrarse en esta zona.

3.3.4.7. Incertidumbre

No existen resultados analíticos cuantitativos válidos si no van acompañados de alguna estimación de los errores inherentes a ellos. La incertidumbre de medida se define como "un parámetro, asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando". O también como "la estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad dada, el valor verdadero de la magnitud medida".

Se calculó, por tanto, la incertidumbre relativa para los 4 niveles de contaminación, cubriendo el rango validado por el procedimiento optimizado. Las contribuciones que se tuvieron en cuenta para su cálculo fueron:

- La de la precisión combinada.
- La inherente a la preparación de las muestras de suelo contaminado usadas en las pruebas de recuperación y precisión. Se tuvo en cuenta la contribución de la preparación de la disolución madre, de las diluciones, y de la incertidumbre al contaminar el suelo.
- No se tuvieron en cuenta las interferencias producidas por la matriz ya que se compensaban al cuantificar con calibrados preparados en matriz, según las recomendaciones de la Guía EA-4/16 [103] y la Guía G-ENAC-09 [104].
- Tampoco se tuvo en cuenta la contribución de la exactitud, porque se comprobó mediante el test del sesgo, que las variaciones eran debidas a los errores aleatorios, y no a los sistemáticos, además de que en ningún caso se aplicaba corrección a las tasas de recuperación.

Con las contribuciones anteriormente expuestas, se calculó la incertidumbre asociada a cada concentración de la validación y se halló la incertidumbre relativa, es decir, el porcentaje de la incertidumbre expandida dividida por la concentración a la que se había calculado. De entre todas las halladas se seleccionó la máxima para aplicarla a todos los valores de las extracciones de herbicidas en suelo extraídas con el método optimizado. De esta forma, al aplicar la incertidumbre máxima, los resultados están suficientemente “protegidos”.

La mayoría de las incertidumbres relativas encontradas fueron menores del 10% para la mayoría de herbicidas (Tabla 3.15). Se utilizó también la incertidumbre máxima relativa calculada a partir de las pruebas de recuperación, llevadas a cabo durante la validación del método optimizado, para el cálculo de la incertidumbre en los valores de las recuperaciones en las pruebas de robustez (Tabla 3.14).

Tabla 3.15. Incertidumbres relativas encontradas para los cuatro niveles de concentración e incertidumbre relativa máxima.

Nº	Herbicida	I rel 25 ppb	I rel 50 ppb	I rel 150 ppb	I rel 250 ppb	I rel máx.
1	Dicamba	8,71	6,31	4,19	4,48	8,71
2	2,4-D	9,29	6,76	3,91	5,08	9,29
3	MCPP	7,69	7,40	4,07	6,02	7,69
4	Diclorprop p	7,96	6,43	3,41	6,04	7,96
5	MCPA	8,28	7,17	4,80	5,11	8,28
6	Amidosulfuron	9,96	7,94	10,07	5,11	10,07
7	Tribenuron metil	5,05	7,55	3,35	4,55	7,55
8	Fenoxaprop p	8,65	7,63	4,97	5,62	8,65
9	Diclofop	7,43	8,00	5,39	6,31	8,00
10	Flamprop	5,30	5,56	5,59	3,89	5,59
11	Bromoxinil	7,46	7,23	4,72	4,08	7,46
12	Ioxinil	4,63	9,84	4,95	4,65	9,84
13	Cianazina	7,70	8,37	4,21	2,49	8,37
14	Terbutilazina	7,13	5,56	5,22	2,82	7,13
15	Terbutrina	6,48	7,55	2,87	2,68	7,55
16	Metribuzina	5,38	7,27	4,58	5,48	7,27
17	Carfentrazona etil	4,85	5,52	6,19	3,14	6,19
18	Metoxuron	8,33	6,07	5,27	8,96	8,96
19	Isoproturon	7,60	7,96	4,72	5,53	7,96
20	Clortoluron	7,62	9,08	4,49	7,34	9,08
21	Metabenzotiazuron	8,94	6,31	5,98	7,33	8,94
22	Linuron	7,96	5,72	7,93	8,80	8,80
23	Tralkoxidim	4,57	8,44	13,22	4,08	13,22
24	Flamprop isopropil	6,68	6,58	5,48	6,51	6,68
25	Mefenpir dietil	8,29	9,09	4,91	6,34	9,09
26	MCPA tioetil	5,70	6,92	7,27	3,95	7,27
27	Bifenox	4,73	5,50	4,09	2,98	5,50
28	Fenoxaprop p etil	6,57	6,03	5,28	2,74	6,57
29	Diclofop metil	5,05	8,76	6,56	6,49	8,76
30	Prosulfocarb	13,66	12,84	12,91	10,59	13,66
31	Trialato	5,13	7,77	4,25	3,26	7,77
32	Diflufenican	8,36	6,45	6,03	6,92	8,36
33	Pendimetalina	5,18	7,18	6,94	4,29	7,18
34	Trifluralina	7,44	10,85	4,54	3,29	10,85
35	MCPP isoocílico	4,46	6,63	7,15	4,80	7,15
36	Bromoxinil octanoato	5,92	8,13	5,82	7,18	8,13
37	Ioxinil octanoato	8,01	6,10	6,30	8,29	8,29

3.4. CONCLUSIONES

De las pruebas realizadas en este capítulo sobre extracción de residuos de herbicidas en muestras de suelo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

Concentración de los Extractos

1. En los procesos de concentración de los extractos existe riesgo de pérdida de los herbicidas más volátiles. Se comprueba que el uso del etilénglicol disminuye estas pérdidas. En consecuencia, la concentración de los extractos, independientemente de su naturaleza, se hace siempre a 35°C, con adición de 50 µl de etilénglicol al 20% en acetona y sin permitir alcanzar la sequedad total.

Optimización de la Extracción

2. El tipo de disolvente es el que más contribuye a la variabilidad de las recuperaciones (49,11% para los ácidos y 67,23% para los básicos y neutros), siendo la acetona la que proporciona los mejores resultados.
3. Se escoge un volumen de 30 ml porque volúmenes mayores producen mayores pérdidas de herbicidas básicos y neutros durante la concentración de los extractos. La principal ventaja de la acetona frente al acetato de etilo y el acetonitrilo es su mayor volatilidad, ya que tiene el menor punto de ebullición y, por tanto, minimiza las pérdidas por evaporación.
4. Los herbicidas ácidos están muy influidos por el porcentaje del ácido acético (46,06%), mientras que la contribución para los básicos y neutros es pequeña (4,09%). Se escoge 1% de ácido acético porque crea un ambiente medianamente ácido que posibilita la recuperación global de los herbicidas, ya que los ácidos y bases débiles se retienen menos a medida que el pH se incrementa, al aumentar (ácidos) o disminuir (bases) la ionización.
5. No es necesario ajustar el pH previamente al reparto con diclorometano, ya que la adición de ácido acético incrementa la recuperación de ácidos en este paso. Los herbicidas ácidos débiles, se hacen más débiles en las mezclas de agua y disolventes orgánicos, de tal forma que su pKa se hace mayor, lo que proporciona su reparto en el disolvente orgánico a partir de la fase acuosa. Para los herbicidas básicos el efecto es el contrario, se protonan a valores de pH acuoso mucho menores que el valor de pKa de la base, siendo también recuperados.
6. El tiempo de extracción no presenta diferencias significativas entre los niveles estudiados, escogiéndose 30 min, ya que proporciona una respuesta ligeramente superior al tiempo de 15 min, sin incrementar mucho la duración de la extracción.
7. La contribución de los errores residuales en el diseño es menor del 10%, lo que indica que se han tenido en cuenta todas las variables que afectan a la respuesta en el diseño.
8. Como conclusión, el método optimizado consiste en (Figura 3.21): la agitación durante 30 min de 15 g de suelo con 7,5 ml de agua en combinación con 30 ml de acetona al 1% en ácido acético, lo que mejora sensiblemente la recuperación de los herbicidas ácidos sin detrimento de la recuperación de los básicos y neutros, y sin necesidad de ajustar el pH previamente al reparto con 30 ml de diclorometano y sulfato sódico anhidro. Es un método sencillo que extrae satisfactoriamente un amplio rango de herbicidas de características fisico-químicas muy diferentes.

Limpieza de los extractos de Suelo

9. El acetato de etilo presenta recuperaciones algo mayores que el acetonitrilo y el metanol en la limpieza del extracto de suelo con un cartucho de C18ne, pero también eluye más interferencias de la matriz, por lo que los cromatogramas quedan más sucios y no interesa como paso de limpieza.
10. Los cartuchos poliméricos con diferentes materiales adsorbentes retienen sobre todo los herbicidas más apolares, por lo que no sirven como paso de limpieza universal para el extracto de suelo.
11. La limpieza con los adsorbentes en polvo por dSPE tampoco mejora las recuperaciones para algunos herbicidas. La adición de PSA aumenta de 2 a 3 unidades el valor del pH del extracto, por lo que los herbicidas pasan a su forma iónica y son retenidos en el adsorbente. De la misma forma, quedan retenidos por la gran capacidad de adsorción de GCB y sus múltiples interacciones.
12. La eliminación de los componentes de la matriz a través de limpiezas de los extractos demuestra no ser útil para este método multirresiduo ya que se determinan herbicidas con un amplio rango de polaridades en una matriz compleja, como el suelo, y los adsorbentes están diseñados para analitos con las mismas características. Como alternativa a la limpieza de los extractos, el uso de GC-MS proporciona una gran especificidad y selectividad.

Validación del método optimizado de extracción

13. En general los analitos extraídos con el procedimiento optimizado presentan efecto matriz, aún incluyendo el reparto con diclorometano que elimina interferencias polares. Por tanto, siempre se usa la cuantificación con calibrados en matriz para evitar una cuantificación incorrecta.
14. El método se valida hasta 250 µg/kg, proporcionando recuperaciones adecuadas, buena precisión para los herbicidas ácidos, básicos y neutros, y robustez frente a suelos agrícolas de distintas características.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Document No. D/00/SuM/5277. European Crop Protection Association. Bruselas. 2000.
2. M.J. Santos-Delgado, E. Crespo-Corral, L.M. Polo-Díez. *Talanta* 53 (2000) 367.
3. Gómez de Barreda. “Características f^a - q^a - b^a s que definen el comportamiento en el suelo de los fitosanitarios”. Sociedad Española de Malherbología. 1998.
4. E. Bascónes Merino. “Análisis de suelo y consejos de abonado”. Serie Cuadernos Didácticos. INEA, Diputación de Valladolid. 2001.
5. E. Primo Yúfera, J.M. Carrasco Dorrien. “Química Agrícola II: Plaguicidas y Fitorreguladores”. Editorial Alhambra. 1977.
6. M.E. Sumner (Ed.). “Handbook of Soil Science”. CRC Press. 2000.
7. H.H. Cheng. “Pesticides in the Soil environment: processes, impacts and modelling”. Soil Science Society of America, Inc. Madison, USA. 1990.
8. S. Guimont. “Devenir des plaguicides dans les soils en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol”. Tesis doctoral. Instituto Nacional Polytechnico de Lorraine, Francia. 2005.
9. G.W. Bailey, J.L. White. *Res. Rev.* 32 (1970) 29.
10. S. Navarro Blaya. “Dinámica de los plaguicidas en el suelo”. En “Plaguicidas en Suelos”. Serie: Monografía del Medio Ambiente nº4. J. Cornejo, JL Pérez Rodríguez (Eds.). Agencia del Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla. 1986.
11. C.T. Chiou, T.D. Shoup. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1985) 4.
12. A. Clark. “The chemisorption bond: basic concepts”. Academic Press, New York, London. 1974.
13. J.W. Hamaker, J.M. Thompson. “Adsorption”. En: “Organic Chemicals in the Soil Environment”. C.A.J. Goring and JW Hamaker (Eds.). Marcel Dekker. New York. 1972.
14. S. Mitra (Ed.). “Sample preparation techniques in analytical chemistry”. Wiley, 2003.
15. E. Barriuso, C. Feller, R. Calvet, C. Cerri. *Geoderma* 53 (1992) 155.
16. C.W. Thorstensen, A. Christiansen. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4199.
17. “E1 - Plant health, 2,4-D”. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General E. 2001.
18. A.E. Smith. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 59 (1995) 97.
19. R. K. Zollinger. “North Dakota Weed Control Guide”. Universidad de Dakota del Norte. 2005.
20. A. Lagana, G. Fago, A. Marino. *Anal. Chem.* 70 (1998) 121.
21. J. Álvarez Benedí, A. Cartón, S. Bolado. *Recent Res. Develop. Agr. Food Chem.* 3 (1999) 259.
22. J.U. Holthius, R. Baumbach, S. Friebe, G.J. Kraus. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 66 (1997) 269.

23. M.D. Luque de Castro, J.L. Luque García, S. Morales Muñoz. "Agua pura y asistida por reactivos: un extractante eficaz y compatible con el ambiente". VIII ISAMEF, International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field. Coruña. 2003.
24. A. Herguedas, J.J. Jiménez, J. Atienza. "Extracción supercrítica de triatato en suelos agrícolas, determinación mediante HRGC con detector de emisión atómica". 7as. Jornadas de Análisis Instrumental. Barcelona. 1996.
25. L. Spack, C. Alvarez, J.M.F. Martins, J. Tarradellas. J. Contam. Hydrol. 33 (1-2) (1998) 171.
26. T. Dagnac, S. Bristeau, R. Jeannot, C. Mouvet, N. Baran. J. Chromatogr. A 1067 (1-2) (2005) 225.
27. C. Molins, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, H.A.G. Heusinkveld, R.A. Baumann. J. Chromatogr. A 869 (1-2) (2000) 487.
28. S. Marchese. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15 (2001) 393.
29. C.G. Zambonin, F. Palmisano. J. Chromatogr. A 874 (2) (2000) 247.
30. E. Barriuso, P Benoît. "State-of-the-art review on bound residues". Report DL5 of the FP6 EU-funded FOOTPRINT project. 2006.
31. Directiva del Consejo No. 91/414/EEC, sobre la puesta en el mercado de productos para la protección de las plantas. OJ L 230 (1991) 1.
32. Document No. SANCO/825/00. "Guidance document on residue analytical methods". Comisión Europea, Dirección general de Protección de la salud del Consumidor. Bruselas. 2004.
33. H.P. Thier, H. Zeumer (Eds.). "Manual of Pesticide Residue Analysis", DFG Pesticides Commission. Vol. I + II. VCH Weinheim. 1987.
34. Anonymous. Agribiol. Res. 46 (2) (1993) 155.
35. W. Specht, S. Pelz, W. Gilsbach. Fresen. J. Anal. Chem. 353 (1995) 183.
36. "Methods for analytes and properties, Chapter 2: Choosing the correct procedure". EPA, SW-846 Methods, Volume One, Section A, Part I. 1996.
37. G. Singh. Environ. Pollut. 66 (1990) 253.
38. J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, A.I. García-Valcárcel, L. Martínez, R.A. Pérez. J Chromatogr. A 754 (1996) 347.
39. E. Papadopouloumourkidou, J. Patsias, A. Kotopoulou. J. AOAC Int. 80 (2) (1997) 447.
40. Z. Vryzas, E. Papadopoulou-Mourkidou J. Agric. Food Chem. 50 (18) (2002) 5026.
41. B.D. Hill, E.H. Stobbe. J. Agric. Food Chem. 22 (6) (1974) 1143.
42. E.N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou. J Chromatogr. A 962 (1-2) (2002) 9.
43. C. Crescenzi, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, M. Nazzari, S. Marchese, R. Samperi. Anal. Chem. 71 (1999) 2157.

44. F. Hernández, J. Beltrán, F.J. López, J.V. Gaspar. *Anal. Chem.* 72 (10) (2000) 2313.
45. G. Shen, H.K. Lee. *J Chromatogr. A* 985 (1-2) (2003) 167.
46. A.E. Smith. *J. Agric. Food Chem.* 29 (1981) 111.
47. M.D. David, S. Campbell, Q.X. Li. *Anal. Chem.* 72 (15) (2000) 3665.
48. O.P. de Amarante, N.M. Brito, T.C.R. dos Santos, G.S. Nunes, M.L. Ribeiro. *Talanta* 60 (1) (2003) 115.
49. C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, E. Miguel, J.L. Tadeo. *J Chromatogr. A* 823 (1998) 17.
50. A.S. Lee, M.K. Hong, A.E. Smith. *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1077.
51. C.S. Hottenstein, S.W. Jourdan, M.C. Hayes, F.M. Rubio, D.P. Herzog, T.S. Lawruk. *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2754.
52. S. Menasseri, W. Koskinen, P.Y. Yen. *Pest. Manag. Sci.* 60 (2004) 297.
53. J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín. *J. AOAC Int.* 83 (2000) 756.
54. E.G. Cotterill. *Analyst* 107 (1982) 76.
55. T. Tsukioka, T. Murakami. *J.Chromatogr. A* 469 (1989) 351.
56. W.T. Kelley, D.L. Coffey, T.C. Mueller. *J. AOAC Int.* 77 (1994) 805.
57. C. Webster, M. Smith, P. Wilson, M. Cooke. *J. High Resolut. Chromatogr.* 16 (1993) 549.
58. Método EPA 8151A. "Chlorinated Herbicides by GC using methylation or pentafluorobenzoylation derivatization". 1996.
59. Método EPA 8321A. "Solvent extractable non-volatile compounds by HPLC/Thermospray/MS or UV detection". 1996.
60. A.W. Ahmed, M.V.N. Bertrand. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (1989) 365.
61. A.E. Smith, L.J. Milward. *J. Agric. Food Chem.* 31 (1981) 633.
62. C. Li, L.M. Markovec, R.J. Magee, B.D.A. James. *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1110.
63. E.A. Rochette, J.B. Harsh, H.H. Hill. *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 1220.
64. V. López-Ávila. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 195.
65. J. Patsias, E.N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou. *J Chromatogr. A* 959 (2002) 153.
66. M.J.M. Wells, L.Z. Yu. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 237.
67. W.L. Budde. *Mass Spectr. Rev.* 23 (2004) 1.
68. J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández. *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 175.
69. N. Rosales Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas. *Anal Chim. Acta* 470 (2) (2002) 147.
70. H. Berrada, G. Font, J.C. Molto. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (1) (2003) 19.

71. H.J. Menne, K. Janowitz, B.M. Berger. *J. AOAC Int.* 82 (6) (1999) 1534.
72. Z.L. Chen, R.S. Kookana, R. Naidu. *Chromatographia.* 52 (3-4) (2000) 142.
73. J.C.F. Fincias. “Estudio de la adsorción de los herbicidas Imazametabenz-metil, Clorsulfuron y Tribenuron metil en suelos de uso agrícola”. Tesina de Licenciatura. Universidad de Valladolid. 1995.
74. A. Herguedas García. “Residuos de Tratamientos con herbicidas en Suelos de Uso Agrícola”. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid. S.I.D.T.A. de la Junta de Castilla y León. 1996.
75. C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo. *Quim. Anal.* 15 (1996) 53.
76. E. Kremer, M. Rompa, B. Zygmunt. *Chromatographia* 60 (2004) 169.
77. P. Mogadati, J.B. Louis, J.D. Rosen. *J. AOAC Int.* 82(3) (1999) 705.
78. “Enciclopedia de las Ciencias de la Separación”. Elsevier.
79. S.J. Lehotay, A. Lightfield, J. Harman-Fetcho, D. Donoghue. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4589.
80. “Métodos oficiales de Análisis. Parte III”. Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación. Madrid. 1994.
81. S.K. Mortensen, C.S. Jacobsen. *Environ. Sci. Technol.* 38 (24) (2004) 6625.
82. “Analytical Methods for Pesticide Residue in Foodstuffs”. 6th Ed. General Inspectorate for Health Protection, Ministry of Health, Welfare and Sport. The Hague. The Netherlands. 1996.
83. Documento N° SANCO/10476/2003, de 5 de febrero de 2004, de la Comisión Europea. “Quality Control Procedures for Pesticide Residue analysis”. Bruselas. 2004. Actualizado por medio del Documento N° SANCO/10232/2006, de 24 de Marzo de 2006. Última actualización: N° SANCO/2007/3131, de 31 de Octubre de 2007.
84. “Method 303 for Non-fatty Foods”. Pesticide Analytical Manual. Food and Drug Administration, Vol. 1, 3rd Edition. EEUU. 1994. Revisado en 1999.
85. C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, J. Atienza. *J Chromatogr. A* 1125 (2006) 244.
86. M. H. Kovacs Jr. *Res. Rev.* 97 (1986) 1.
87. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
88. A. Tanabe, H. Mitote, K. Kawata, M. Sakai, A. Yasuhara. *J. AOAC Int.* 83 (1) (2000) 61.
89. E. Papadopoulou-Mourkidou, J. Patsias, A. Kotopoulou, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 447.
90. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcárcel, J.L. González. *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4265.
91. H. Prosen, L. Zupancic-Kralj, J. Marsel. *J Chromatogr. A* 704 (1995) 121.
92. G.W. Tindall. *LC-GC N. Am.* 20 (2002) 11.
93. C.D.S. Tomlin (Ed.). “The Pesticide Manual”, Version 2.1. British Crop Protection Council, Farnham. 2001.

94. D.J. Sutherland, G.K. Stearman, M.J.M. Wells. *J Agr. Food Chem.* 51 (2003) 14.
95. K. Mastovska, S. Lehotay. *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 259.
96. S. Espinosa, E. Bosch, M. Roses. *Anal.Chem.* 72 (2000) 5183.
97. I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Roses. *Anal. Chem.* 72 (2000) 1802.
98. A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Rao, R. Samperi, E. Sebastiani. *J Chromatogr. A* 878 (1) (2000) 87.
99. F. Anastassiades, K. Mastovska, S.J. Lehotay. *J Chromatogr. A* 1015 (2003) 163.
100. M. Thompson, S.L. R. Ellison, R. Wood. "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis". *Pure and Applied Chemistry*, 74(5) (2002) 835.
101. E. Macutkiewicz, R.M. Zygmunt. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (1) (2003) 1.
102. W. Kordel, G. Kotthoff, J. Müller. *Chemosphere*, 30 (1995), 1373.
103. Guía EA-4/16, "Guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing".
104. Guía G ENAC-09 "Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cualitativos". Rev. 1 Julio 2005.

CAPÍTULO 4:

***COMPARACIÓN DE EXTRACCIONES
MULTIRRESIDUO DE HERBICIDAS EN
MUESTRAS DE CEBADA***

ÍNDICE

4.1. Introducción	149
4.1.1. Interacción Planta:Herbicidas	149
4.1.2. Técnicas de Extracción de Residuos de Herbicidas en Material Vegetal.....	150
4.1.3. Métodos de Extracción de Residuos de Herbicidas en Material Vegetal.....	150
4.1.3.1. Principales Métodos Oficiales	150
4.1.3.2. <i>QuEChERS</i>	153
4.1.4. Limpieza de Muestras de Material Vegetal	154
4.1.5. Objetivos.....	155
4.2. Material y Métodos	156
4.2.1. Analitos.....	156
4.2.2. Material de Laboratorio	156
4.2.3. Muestras de Cebada.....	157
4.2.4. Extracciones en el RIKILT	158
4.2.4.1. <i>QuEChERS</i>	159
4.2.4.2. Método del Acetato de Etilo.....	159
4.2.4.3. Método mini Luke	159
4.2.4.4. Método de la Acetona.....	161
4.2.5. Adaptación de los Métodos en el ITACyL.....	161
4.2.5.1. <i>Buffered QuEChERS</i>	162
4.2.5.2. Extracción de Residuos de Herbicidas en Muestras de Paja	162
4.2.6. Análisis	164
4.3. Resultados y Discusión	165
4.3.1. Extracciones en el RIKILT	165
4.3.1.1. <i>QuEChERS</i>	165
4.3.1.2. Comparación de Métodos.....	167
4.3.1.3. Evaluación del Efecto Matriz	168
4.3.2. Adaptación de Métodos en el ITACyL.....	171
4.3.2.1. Comparación de Métodos.....	171
4.3.2.2. Diferencias entre la Extracción de Residuos de Herbicidas en Muestras de Grano y Muestras de Paja	176
4.3.2.3. <i>QuEChERS - Buffered QuEChERS</i>	179
4.3.3. Validación.....	182
4.3.3.1. Especificidad/Selectividad.....	182
4.3.3.2. Linealidad	182
4.3.3.3. Límites de Detección y Cuantificación	182
4.3.3.4. Exactitud (Recuperación) y Precisión	185
4.3.3.5. Incertidumbre	188
4.4. Conclusiones	190
4.5. Bibliografía	193

4.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos prioritarios del control sanitario en alimentos hoy en día es el control de los residuos de herbicidas debido a su posible toxicidad, tal y como se recoge en la Directiva 98/82/CE, por lo que se plantea su estudio en muestras de cebada.

4.1.1. INTERACCIÓN PLANTA:HERBICIDAS

Los cereales son matrices complejas cuya composición química varía en función de la especie y variedad cultivada, así como también en función de las condiciones climáticas y de los métodos de cultivo.

El principal componente del grano de cebada es el almidón y otros hidratos de carbono [1]. El contenido en proteína suele variar entre 10 y 11%, siendo las más importantes la albúmina, globulina y prolamina. La presencia de grasas, entre ellas mono, di, y triglicéridos, ácidos grasos, y esteroides, es escasa. El contenido en agua puede variar entre 11 y 20%, ya que en un ambiente húmedo los granos pueden absorberla. La paja de cebada se caracteriza por un reducido valor nutritivo debido al escaso nivel de proteína (entre 4 y 6 %) y a su alto contenido en fibra o pared celular [1].

La absorción de los herbicidas por las plantas constituye una de las vías más importantes de eliminación de fitosanitarios en el medio ambiente. Cuando se aplica un herbicida se produce un depósito en la planta que es eliminado progresivamente, con mayor o menor rapidez en función de factores tales como, la tasa de crecimiento del vegetal, las condiciones ambientales (viento y lluvia), las propiedades físico-químicas del herbicida (volatilización y solubilización) y la degradación química, que puede ocurrir en el interior de la planta (para los herbicidas con poder penetrante) o en la superficie de la misma, en cuyo caso juega un papel importante la radiación solar.

Los herbicidas con coeficientes de reparto muy grandes, actúan por evaporación y posterior absorción por las hojas y los tallos. Existen varios factores que influyen en la volatilización del herbicida aplicado, como son, la temperatura, la humedad y su formulación. En muchos casos, el herbicida penetra con mayor facilidad cuanto mayor es la humedad relativa del ambiente, por lo que lo hace preferentemente por la vía acuosa. En periodos de sequía, sin embargo, los espacios porosos llenos de aire y las pectinas deshidratadas impiden la absorción y la entrada es por vía lipóide.

El pH, a su vez, desempeña un papel fundamental, ya que cuanto menor es el pH de la formulación, mayor es la proporción absorbida, debido a que la acidez no sólo impide la ionización del herbicida empleado, sino que también reduce la carga negativa residual de la cutícula, haciéndola más permeable [2]. Los herbicidas cargados positivamente se aplican en las hojas ya que su aplicación en el suelo les inactiva al estar muy atraídos por la superficie de éste, principalmente las arcillas negativas.

La lixiviación puede afectar a la actividad del herbicida de varias maneras. Cuando el principal modo de entrada del herbicida es a través de los brotes y hojas, la lixiviación desde la superficie de la zona previa a la germinación de la hierba puede reducir la concentración del herbicida disponible y, por tanto, su efectividad. Cuando la entrada es a través de las raíces, el movimiento vertical del herbicida asegura que se mantiene disponible y maximiza su actividad. Una excesiva lixiviación tiene implicaciones medioambientales y tiene que tenerse en cuenta un cuidadoso equilibrio entre las propiedades que producen un sólido control de las malas hierbas y las que producen contaminación [3].

4.1.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE RESIDUOS DE HERBICIDAS EN MATERIAL VEGETAL

Las técnicas de extracción de residuos de herbicidas en material vegetal son análogas a las expuestas para las muestras de suelo en el Capítulo 3, pero adaptadas a alimentos, en este caso, material vegetal.

Las extracciones convencionales con disolventes, en donde la muestra se homogeniza con una cantidad fija de disolvente, son las técnicas más usadas para extraer residuos de herbicidas de matrices vegetales. La optimización de los procedimientos implica utilizar una secuencia de disolventes de diferentes polaridades, incluyendo disoluciones acuosas, aumentar el contacto con la matriz, como en la extracción por ultrasonidos, o el uso de temperaturas y presiones elevadas, como en la extracción con Soxhlet, MASE o ASE, para conseguir una extracción exhaustiva [4].

Una tendencia general en la extracción de estos compuestos es la reducción del uso de disolventes. La SFE es una alternativa viable para la extracción de muestras no grasas [5], aunque debido a su gran selectividad, no cubre el amplio rango de analitos que pueden extraerse con los disolventes orgánicos, ni siquiera con el uso de modificadores [6].

En los últimos años se busca la miniaturización para reducir el consumo de disolventes al mismo tiempo que se consiguen procedimientos lo más universales posible [5]. En este sentido destacan la SPME, en la que no se utilizan disolventes, y SBSE, que realiza microextracciones en el propio vial de análisis, o la dispersión en matriz (MSPD), en la cual se mezcla la muestra con un adsorbente, lo que permite la extracción y limpieza de la muestra en un único paso [7]. Otros desarrollos recientes en los diseños de inyección han sido la introducción directa de muestra (DSI) o la introducción difusa de matriz (DMI), que permiten el análisis directo de extractos crudos que se limpian *on-line*.

Existen numerosas revisiones sobre el tema que proporcionan comparativas de las distintas técnicas que pueden emplearse [8].

4.1.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE RESIDUOS DE HERBICIDAS EN MATERIAL VEGETAL

4.1.3.1. Principales Métodos Oficiales

Existen un gran número de métodos oficiales desarrollados para la extracción de fitosanitarios en material vegetal, a diferencia de lo que ocurría para las muestras de suelo. Esto es debido a que los alimentos pueden consumirse cerca de las fechas de aplicación de los fitosanitarios y, por tanto, son los que suelen presentar las concentraciones más altas de estos residuos y una mayor problemática [9].

La extracción de residuos de herbicidas en material vegetal, depende de la polaridad del herbicida, así como del tipo de matriz. Un gran número de herbicidas de distintas familias y polaridades, se extraen mezclando, triturando u homogenizando las muestras de material vegetal con diferentes disolventes orgánicos de polaridad media o alta, como la acetona, el acetonitrilo, el acetato de etilo o el metanol, normalmente en mezclas con agua con o sin ajuste de pH [6,10,11]. Posteriormente se realiza un reparto entre una fase acuosa y una fase orgánica y pueden incluirse pasos de limpieza.

En los laboratorios de control de residuos de plaguicidas en alimentos pronto se evidenció la imposibilidad de aplicar métodos de análisis individuales de residuos, ya

que cada vez existían plaguicidas en mayor número. Por consiguiente, se realizó un esfuerzo coordinado, que dio como resultado la aprobación de métodos oficiales multirresiduo.

Los primeros fueron desarrollados a principios de los años 60, y estaban enfocados a la recuperación de plaguicidas organoclorados. Se utilizaba el **Método Mills** [12], en el cual los plaguicidas se extraían de alimentos no grasos con acetonitrilo. Se añadían sales y agua al extracto y los plaguicidas se repartían en disolventes no polares, como éter de petróleo o hexano, y se purificaban mediante columnas de Florisil, para separar el agua y los componentes polares de la matriz.

Cuando se empezaron a usar plaguicidas más polares, como los organofosforados, se necesitaron nuevos métodos, ya que con el método Mills no se transferían del acetonitrilo al éter de petróleo o bien no eran eluidos de la columna de Florisil. En los años 70, se reemplazó el método Mills por el **Método Luke o Método FDA PAM I 302** [13,14], que usaba acetona en lugar de acetonitrilo en el primer paso de la extracción, y un reparto posterior en disolventes no polares con la adición de Na₂SO₄ anhidro para recuperar los plaguicidas polares que se perdían en la fase acuosa [15]. El método Luke, es aún, hoy en día, la base de la mayoría de métodos que se usan para el control de alimentos no grasos, como frutas y verduras [16]. Algunas mejoras llevadas a cabo implican el uso de menos cantidad de muestra y disolventes, como en el método mini Luke usado por el Gobierno Holandés [16,17], la sustitución del reparto con diclorometano por acetato de etilo y ciclohexano en el método S19 del Gobierno Alemán [18], o el uso de SPE para simplificar la preparación de muestras y obtener extractos más limpios [8].

El **Método del Acetato de Etilo** [19,20] fue introducido en Suecia en 1989 [21] como una alternativa al Luke para la extracción de muestras no grasas porque era más rápido, sencillo, limpio, y proporcionaba muy buenas recuperaciones, y desde entonces ha sido constantemente adaptado para permitir la extracción de diferentes analitos. Sus ventajas han hecho que se convierta en el método oficial para algunas autoridades europeas, entre ellas la española [22], aunque el Luke sigue siendo el método más usado a nivel europeo. El método consiste en una extracción con acetato de etilo, un reparto con suficiente Na₂SO₄ anhidro para eliminar el agua con la que el acetato de etilo es prácticamente inmisible, y una limpieza final con GPC [23] o Florisil. Aumenta la extracción de compuestos polares comparado con el método Luke pero también extrae más interferencias polares de la matriz.

Otros métodos oficiales, como el Multirresiduo Canadiense [24], siguen apostando por la extracción con acetonitrilo y NaCl, separando ambas fases por centrifugación, y limpieza por cartuchos C18 y aminopropil. Por otra parte, el método Alder alemán [25], utiliza metanol.

La mayoría de los laboratorios de control alimentario, utilizan modificaciones de los métodos anteriormente expuestos, porque aunque se encuentran muchos métodos en la literatura científica, existen ciertas limitaciones para poder reconocer los resultados oficiales. Puede encontrarse un compendio de estos métodos publicados en alguno de los siguientes manuales:

- *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, del Ministerio de Salud Pública Holandés [17],
- *Manual of Pesticide Residue Analysis (Deutsche Forschungsgemeinschaft)*, del Gobierno Alemán [18];

- *Pesticide Analytical Methods in Sweden*, del Gobierno Sueco [21];
- Métodos oficiales del *AOAC International* [26];
- *Pesticide Analytical Manual (PAM)*, de la FDA (EEUU) [27];
- *Manual of Pesticide Residue Analysis*, en las Guías OPPTS – *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances* - (860.1340 *Residue Analytical Methods*, para Plantas y Animales) de la EPA (EEUU).

En cuanto al análisis de residuos dentro del *Plan Nacional de Vigilancia de Residuos de Productos Fitosanitarios en Origen* (PNVR), los métodos de análisis utilizados para la determinación de residuos de herbicidas en alimentos son establecidos por las Comunidades Autónomas de conformidad con las normas básicas establecidas por los Ministerios implicados, Agricultura y Sanidad. Se escogen entre métodos comprobados y científicamente válidos, siempre que ello no constituya un obstáculo para la libre circulación de productos y que concuerden con la regulación que se aplique de los modos y métodos comunitarios [33].

También el Documento N° *SANCO/825/00* de la EU [28], propone los métodos de Luke (1,2) y Acetato de etilo (3,4) como multiresiduo para plaguicidas en material vegetal (Figura 4.1):

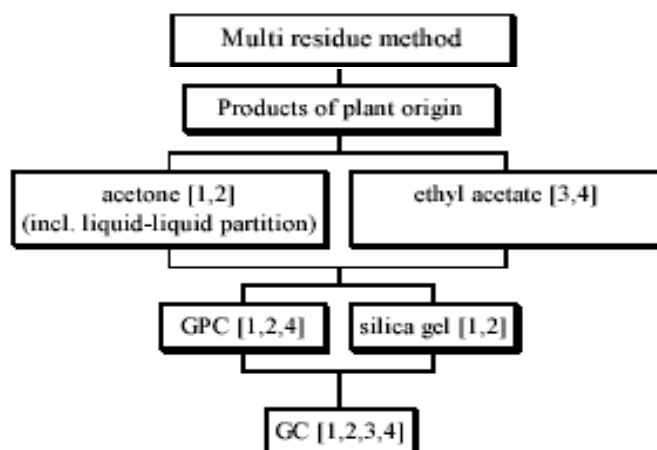


Figura 4.1. Métodos multiresiduo para plaguicidas en material vegetal propuestos por el Documento N° *SANCO/825/00* [28]. Método 1 [18], Método 2 [29], Método 3 [30], Método 4 [17].

En principio estos métodos multiresiduo se usan para determinar un gran número de plaguicidas neutros y básicos directamente analizables por GC, pero también pueden aplicarse a analitos ácidos y fenólicos si se acidifican los extractos antes del reparto [31].

Otros métodos proponen la extracción a partir de soluciones acuosas a pH básico, seguido de una extracción con disolventes orgánicos. De la misma forma, las Sulfonilureas se han extraído del material vegetal con soluciones tampón acuosas a pH 6-7, en las que están en forma aniónica.

Los ácidos carboxílicos se aplican en forma de ésteres, sales o ácidos libres. Los ésteres se hidrolizan rápidamente en la planta, por lo que tendrán que analizarse ambas formas

[32]. Algunos métodos proponen una hidrólisis ácida o básica para liberarlos de las formas conjugadas que forman con la matriz. Pueden hidrolizarse previamente a la extracción con disolventes orgánicos o posteriormente, lo que es más ventajoso porque libera menos interferencias conjugadas desde la matriz [10,17].

4.1.3.2. *QuEChERS*

Anastassiades *et al.* publicaron en 2003 un método que proporcionaba resultados satisfactorios reduciendo notablemente los pasos en el desarrollo de la extracción y el consumo de materiales y disolventes [34]. Se denominó al método con el nombre *QuEChERS*, un acrónimo que reflejaba sus principales ventajas (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*).

La preparación de la muestra siempre es el mayor cuello de botella en el procedimiento analítico completo para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos [35]. El procedimiento multirresiduo *QuEChERS* omite o sustituye muchos pasos analíticos complicados utilizados normalmente en los métodos tradicionales, por otros más fáciles.

El procedimiento original consiste en la extracción de una muestra homogenizada mediante agitación manual o con el agitator, con la misma cantidad de acetonitrilo, para conseguir un extracto final lo suficientemente concentrado sin necesidad de incluir un paso de evaporación del disolvente. Una ventaja en la extracción con acetonitrilo, en lugar de acetona, es que el acetonitrilo se separa más fácilmente del agua con la adición de una mezcla de sales apropiadas (sulfato de magnesio anhidro, $MgSO_4$, y cloruro sódico, $NaCl$) que proporcionan una adecuada separación de fases sin necesidad de diluir el extracto con disolventes no polares tóxicos al mismo tiempo que recupera grandes cantidades de plaguicidas, incluyendo los polares [11].

Después de la centrifugación, que proporciona una buena separación física de las fases (Figura 4.2), se produce la limpieza del extracto mediante dSPE, en el cual se mezclan PSA y más $MgSO_4$ anhidro con el extracto.



Figura 4.2. Disposición de fases de un extracto de material vegetal obtenido con el método *QuEChERS* tras centrifugar. El material vegetal queda en medio separando la fase orgánica, de la fase acuosa y las sales que permanecen en el fondo.

Una de sus principales desventajas frente a otros métodos, es que se obtienen extractos finales muy poco concentrados (1 g muestra/ml extracto) comparado con los extractos obtenidos en la mayoría de métodos tradicionales. Para conseguir los LC deseados en

los sistemas analíticos modernos, el extracto final debe concentrarse, de tal manera que la inyección de 1/2 µl en *splitless* proporcione el grado de sensibilidad necesario. Sin embargo, si se pretende evitar la concentración del extracto ya que puede producir pérdidas, se necesitan sistemas de inyección PTV que permiten la inyección de grandes volúmenes de muestra (20-100 µl).

Actualmente este método está siendo evaluado por multitud de laboratorios, debido a su gran aceptación, y se ha obtenido la validación para un gran número de plaguicidas, paso previo para la aceptación de este método como sustituto de los métodos oficiales existentes [36,37].

Aunque es un método de extracción muy simple, cubre un amplio abanico de materias activas de diferentes características fisicoquímicas, incluyendo plaguicidas polares, así como ácidos y básicos [33,37,38].

Se han publicado ciertas variaciones respecto del método original [39]. La recuperación de algunos analitos en algunas matrices depende del efecto del pH, siendo, por ejemplo, algunos herbicidas sensibles al pH básico. Sin embargo, el hecho de que pocos plaguicidas se degraden en condiciones ácidas, ha llevado a modificar el método por uno llamado *Buffered QuEChERS*. En él se consigue un efecto tampón, añadiendo ácido acético al acetonitrilo y reemplazando el NaCl por acetato sódico, NaAc, sal conjugada del ácido acético. De esta manera, mediante el uso de un tampón apropiado durante la extracción, se consiguen mejores recuperaciones de los herbicidas sensibles a ácidos y bases independientemente del pH de la matriz, sin incrementar el número de pasos en la extracción ni afectar a las recuperaciones de otros plaguicidas extraídos en el multiresiduo.

4.1.4. LIMPIEZA DE MUESTRA

Las técnicas de limpieza de muestras de material vegetal son análogas a las expuestas para las muestras de suelo en el Capítulo 3.

Los métodos multiresiduo clásicos de extracción, que se han expuesto, son poco selectivos y la mayoría de muestras de material vegetal, debido a su alto contenido en clorofila, carotenoides, ceras o grasas, precisan de un paso de limpieza.

Existe una gran variedad entre estas técnicas, de las que ya se habló en el Capítulo 3. Los métodos clásicos multiresiduo utilizan comunmente las limpiezas por SPE, o por reparto con un disolvente apolar e inmiscible con el agua, para la acetona o el acetonitrilo, mientras que el acetato de etilo es más compatible con la limpieza por GPC [11].

El método *QuEChERS* utiliza la dSPE. Una de las imperfecciones de este método es que la limpieza con PSA no es válida para los ácidos carboxílicos debido a que son fuertemente retenidos en el PSA durante la etapa de limpieza, y además no elimina la clorofila de los extractos [39].

Las limpiezas están diseñadas para purificar los extractos y permitir disminuir los LC y minimizar los problemas del análisis. Sin embargo, la mayoría de estos pasos adsorben, eliminan, o destruyen algunos residuos de interés del extracto, además de aumentar el tiempo y los costes del análisis, por lo que suelen reducirse al mínimo o eliminarse completamente [31].

4.1.5. OBJETIVOS

- Comparar los métodos oficiales multirresiduo más importantes para la extracción de herbicidas en cebada, con un método novedoso, publicado en 2003 y denominado *QuEChERS*, que omite o sustituye pasos analíticos complicados utilizados normalmente en los métodos tradicionales, por otros más fáciles y, que se supone, cubre un amplio abanico de materias activas de diferentes características físico-químicas. Este estudio se realiza durante una estancia en el Departamento de Plaguicidas y Contaminantes de RIKILT, Instituto de Seguridad Alimentaria, en Wageningen (Holanda).
- Adaptar los métodos comparados en el RIKILT, a las posibilidades de equipamiento del Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL. Experimentar una variante del *QuEChERS* denominada *Buffered QuEChERS*, y extraer muestras de paja para comparar los resultados con los de grano, ya que sus composiciones son diferentes.
- Escoger los métodos más adecuados y validarlos para la extracción de las muestras de grano y paja obtenidas de los ensayos en campo con herbicidas.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. ANALITOS

Las disoluciones madre (2000 mg/l) que se utilizaron durante la estancia en el RIKILT se prepararon en acetona y se almacenaron en oscuridad a -20°C. Antes de usarlas, para preparar diluciones de trabajo en acetonitrilo de 1 mg/l, se dejaban atemperar 2 horas. Los dos patrones internos utilizados fueron Simazina-D5 y PCB-198.

La preparación de las disoluciones patrón de los analitos que se utilizaron para las experiencias adaptadas al Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL se detalló en el Apartado 2.2.2.

Los herbicidas se agruparon en función de sus propiedades ácido-base, al ser las que más afectaban a la extracción, como ya se detalló en la Tabla 3.2. El uso del LC-(ESI)-MS/MS en el RIKILT, permitió que se pudieran analizar 11 residuos más de herbicidas (compuesto 38 al 49, en la Tabla 4.2) de polaridad media y alta, cuyo análisis por GC-MS no era posible. El MCPP isooctílico y algunos ácidos (del Fenoxaprop p, n=8, al Ioxinil, n=12) no se incluyeron en los estudios en el RIKILT.

4.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

Los reactivos utilizados fueron los mismos que los detallados en los Apartados 2.2.1. y 3.2.1. El material de laboratorio y los equipos utilizados son los detallados en los Apartados 2.2.3. y 3.2.3.

En el RIKILT se utilizaron recipientes de PTFE de 50 y 250 ml con rosca para las extracciones llevadas a cabo con el método mini Luke y el *QuEChERS* (Figura 4.2).

Las extracciones llevadas a cabo con el método mini Luke se realizaron triturándolas y extrayéndolas en un Homogenizador Ultra-turrax T25 de IKA Labortechnik (Staufen, Dinamarca) (Figura 4.3).



Figura 4.3. Equipo usado para homogenizar las muestras de cebada con el método mini Luke.

Los extractos del grano de cebada obtenidos con el método del acetato de etilo en el RIKILT se limpiaron mediante GPC (Figura 4.4). Para ello se utilizó una bomba Merck

Hitachi LaChrom Pump L-7110 equipada con un inyector Gilson Dilutor 401 ASPEC modelo 202 (Middleton, WI) y un detector Jasco Intelligent UV-975 (Easton, MD). Se emplearon dos columnas, la primera una pre-columna Envirogel diclorometano, 150 mm × 10 mm y una segunda columna analítica Envirogel diclorometano, 300 mm × 19 mm, ambas suministradas por Waters. La fase móvil, formada por una mezcla de ciclohexano y acetato de etilo (1:1) se mantuvo constante a 5 ml/min.



Figura 4.4. Equipo de GPC utilizado para limpiar los extractos del grano de cebada obtenidos con el método del acetato de etilo.

4.2.3. MUESTRAS DE CEBADA

Las pruebas desarrolladas durante la estancia en el RIKILT se realizaron con muestras de cebada ecológica para asegurar que no tenían residuos de herbicidas. Se molieron los granos de cebada, se liofilizaron y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su extracción.

Las muestras utilizadas en el Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL se recogieron en una parcela experimental perteneciente al ITACyL donde se había sembrado cebada, no se habían realizado tratamientos con fitosanitarios y posteriormente se utilizaría para los ensayos de disipación en campo detallados en el Capítulo 5. Se recogían en el tiempo de la cosecha y lo más secas posible.

Se dejaban secar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se igualaba su humedad con la del laboratorio. Se separaba la paja del grano con tijeras y se trillaba para eliminar las espigas (Figura 4.5). Se molía el grano y la paja por separado, teniendo cuidado de dejar enfriar el molinillo cuando se calentaba mucho y limpiándolo bien entre muestras (Figuras 4.6 y 4.7). Para favorecer el molido de la paja se secaban en estufa durante toda la noche dentro de bolsas de papel y nunca a más de 40°C, para evitar la degradación de los posibles residuos de herbicidas. Una vez picadas las muestras, se congelaban a -20°C hasta su extracción, en oscuridad y en botes de vidrio cerrados para que no absorbieran humedad durante el almacenamiento.

Se prepararon muestras fortificadas contaminando 100 g de muestras blancas de cebada, que se habían dejado descongelar previamente a temperatura ambiente, con diferentes volúmenes de las soluciones patrón de trabajo de los herbicidas y de los patrones internos. La cebada fue entonces homogenizada por agitación mecánica durante 30 min y el disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente, controlándolo por pesada.



Figura 4.5. Trilladora.



Figuras 4.6 y 4.7. Picadora y molinillo usados para las moler las muestras de paja y de grano.

4.2.4. EXTRACCIONES EN EL RIKILT

Al igual que en el caso de las muestras de suelo, se escogió la extracción por agitación ya que no requería equipamiento complicado, proporcionaba buenos resultados y era de fácil implementación en la mayoría de laboratorios, además de ser la utilizada por la mayoría de métodos oficiales para muestras de material vegetal. En la Figura 4.8 se han comparado los pasos más importantes de las distintas extracciones estudiadas.

4.2.4.1. *QuEChERS*

El método *QuEChERS* está diseñado para muestras que contienen más del 75% de humedad y, por tanto, tuvo que adaptarse a las muestras de cebada que contenían muy poca agua. Además, este tipo de muestras contienen muchas interferencias de la matriz, y, se recomienda reducir la cantidad de muestra que se toma a 1-5 g en lugar de 10 g [40]. Se tomaron, por tanto, en un recipiente de PTFE de 50 ml, 2,5 g de cebada en lugar de 10 g, cantidad de muestra del procedimiento original. Los otros 7,5 g se rellenaron con agua para proporcionar la humedad adecuada y hacer los poros en la muestra más accesibles al disolvente de extracción. Por último se añadió el primer patrón interno (Simazina-D5), que controlaba la extracción.

Se añadieron 10 ml de acetonitrilo a la muestra y se agitó 1 min con la mano. Posteriormente, se añadieron 1 g de NaCl y 4 g de MgSO₄ y se volvió a agitar la muestra otro minuto más con la mano. Se observó que la hidratación del MgSO₄ anhidro era exotérmica, pero no demasiado, en torno a 40°C, lo que no suponía riesgos de volatilización o degradación de los herbicidas. Parece ser que este calor generado incrementaba la extracción, al mismo tiempo que ayudaba a verificar que el agua se había eliminado del extracto [6,41]. Posteriormente se centrifugó 5 min a 2500 rpm y se obtuvo una separación de fases adecuada, quedando el extracto orgánico en la fase superior (Figura 4.2).

Se tomaron dos alícuotas del extracto orgánico, para realizar el análisis de manera diferente. La primera alícuota se limpió con 25 mg de PSA y se secó con 150 mg de MgSO₄ mezclándolo todo en un agitatus. Después de la centrifugación, se recuperó 1 ml del extracto limpio que se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,45 µm, y posteriormente, se añadieron 60 µl de una disolución de 1 mg/l de PCB-198, usado como segundo patrón interno, antes del análisis por GC-TOF/MS. Se tomó una segunda alícuota de 0,25 ml, se añadieron 0,25 ml de agua, se agitó, se filtró, y se le añadió el

segundo patrón interno. Fue directamente analizada por LC-MS/MS, sin limpieza con PSA, ya que se sabía que este adsorbente retenía los herbicidas ácidos [11].

Debido a la adaptación del método *QuEChERS* a cebada, 2,5 g de muestra se diluyeron en 10 ml de acetonitrilo, de tal forma que las muestras se diluían 4 veces, en lugar de la relación 1:1 usada en el método original. Para poder comparar este método con los otros, se diluyeron los extractos obtenidos hasta un volumen equivalente al *QuEChERS* (1:4), de tal forma que era comparable tanto la cantidad de analitos como de interferencias de la matriz en todos los extractos.

4.2.4.2. Método del Acetato de Etilo

En esta aproximación del método, se mezclaron 5 g de cebada contaminada con 10 ml de agua en un frasco de vidrio topacio de 100 ml y se dejaron reposar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se agitaba la muestra horizontalmente durante 4 horas con 50 ml de acetato de etilo. Se introducía una bola de cristal en el frasco para que ayudase a mezclar la muestra con el disolvente.

Después se añadía suficiente Na_2SO_4 anhidro para unirse al agua, se centrifugaba la mezcla a 2500 rpm durante 5 min, y se filtraba el extracto a través de un filtro con lana de vidrio y más Na_2SO_4 anhidro. Se recuperaban 25 ml del extracto que se llevaban a sequedad a 35°C con una corriente de nitrógeno de 0,5 bar. Se reconstituía el extracto con 1 ml de ciclohexano:acetato de etilo (1:1) y se filtraba por un filtro de PTFE de 0,45 μm .

0,95 ml del extracto filtrado se limpiaban mediante GPC, para eliminar las interferencias de elevado peso molecular. Se recogían 10 ml del eluido después de los primeros 22 minutos, tiempo determinado previamente de forma experimental con patrones, demostrando ser suficiente para separar las moléculas interferentes más grandes.

El eluido se volvía a concentrar a 35°C con una corriente de nitrógeno de 0,5 bar, se le añadía el segundo patrón interno, y se rellenaba con acetonitrilo hasta una concentración equivalente a la de *QuEChERS*, es decir, de 0,25 g/ml.

4.2.4.3. Método mini Luke

Este método es una versión miniaturizada del método Luke, que se utiliza en Holanda [16,17]. En esta aproximación, 5 g de cebada contaminada y 10 ml de agua se introducían en un tubo de PTFE de 250 ml de centrifuga y se homogenizaban con 20 ml de acetona durante 1 min en un homogenizador.

Posteriormente, se añadían 20 ml de diclorometano y 20 ml de éter de petróleo y se volvía a extraer la muestra durante 20 seg en el homogenizador, lo que proporcionaba el reparto de las fases. Se enjuagaba el homogenizador con 10 ml de acetona. A continuación, se añadía suficiente Na_2SO_4 anhidro para unirse al agua, se centrifugaba la mezcla a 2500 rpm durante 5 minutos y se filtraba el extracto a través de un filtro con lana de vidrio y más Na_2SO_4 anhidro.

Se recuperaban 28 ml del extracto que se llevaban a sequedad a 35°C con una corriente de nitrógeno de 0,5 bar. Entonces, se añadía el segundo patrón interno al extracto concentrado y se rellenaba con acetonitrilo hasta una concentración equivalente a la de *QuEChERS*.

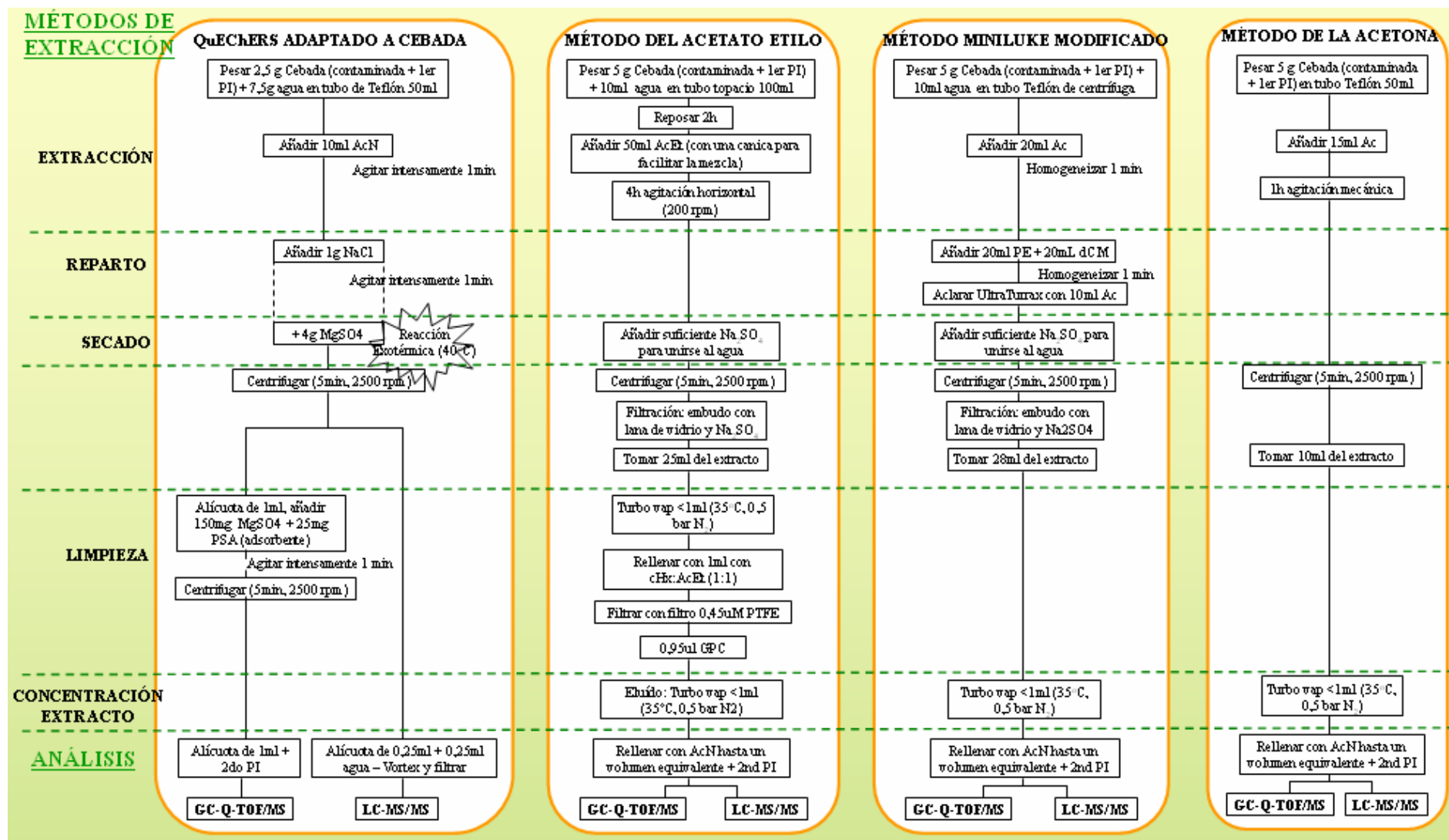


Figura 4.8. Comparación de las etapas más importantes de los 4 métodos ensayados en el RIKILT [42].

4.2.4.4. Método de la Acetona

Se tomaron 5 g de cebada contaminada en un frasco de vidrio topacio y se agitaron durante 1 h con 15 ml de acetona.

Después de centrifugar la muestra durante 5 min a 2500 rpm, se llevaron 10 ml del extracto a sequedad a 35°C con 0,5 bar de nitrógeno. Se añadió el patrón interno y se rellenó con acetonitrilo hasta una concentración equivalente a la de *QuEChERS*.

4.2.5. ADAPTACIÓN DE LOS MÉTODOS EN EL ITACyL

Se contaminaron las muestras al mismo nivel que las pruebas desarrolladas en el RIKILT para poder compararlas.

Hay que tener en cuenta que los análisis en el ITACyL se llevaron a cabo con un GC-MS con un sistema de inyección *split/splitless*, por lo que hubo que concentrar los extractos finales para obtener los LC requeridos, y hubo una serie de analitos que no pudieron analizarse al no disponer de un LC-(ESI)-MS/MS. Se concentraron únicamente 4 ml del extracto, teniendo en cuenta que las muestras de cebada se diluían 4 veces al añadir el agua antes de la extracción, para que los extractos finales fueran análogos a los obtenidos por los creadores del método.

El hecho de tener que analizar todos los analitos por GC implicaba la derivatización de los ácidos según la reacción optimizada en el Capítulo 2, y debido a la doble formación de los ésteres metílicos a partir de los ácidos por esterificación y de sus ésteres conjugados por trans-esterificación, se realizaron las pruebas de comparación de métodos por separado para los ácidos, por una parte, y los básicos y neutros, por otra, análogamente al Capítulo 3 para las muestras de suelo.

Así, después del reparto de fases obtenido con las sales, se tomaron dos alícuotas. De la primera se limpiaron 4,5 ml del extracto con 100 mg de PSA y se secaron con 600 mg de MgSO₄ en el agitatorubos. Después de la centrifugación, se recuperaron 4 ml del extracto limpio que se concentraron, al igual que otros 4 ml de la segunda alícuota a la que no se le aplicaba limpieza. Posteriormente, ambas alícuotas se redisolvían en 1 ml con acetona acidificada con 1% de ácido acético, y se les añadía el patrón interno (Alacloro). Se filtraban a través de un filtro de PTFE de 0,45 µm, y se dividían a su vez en dos alícuotas, la que contenía los herbicidas básicos y neutros analizada directamente, y la que contenía los herbicidas ácidos analizada tras añadir 100 µl de TMSH al vial.

En el método del acetato de etilo no se realizó la limpieza por GPC ya que no se contaba con este equipamiento. Los 25 ml de extracto se pasaron por un embudo con Na₂SO₄ anhidro y se llevaron a sequedad directamente, redisolviéndolos hasta una concentración equivalente a *QuEChERS*.

En el mini Luke se llevaron 30 ml del extracto a sequedad. A su vez, se ensayó una modificación para recuperar los herbicidas ácidos, mediante la acidificación del extracto con ácido clorhídrico a pH menor que 2 antes del reparto con disolventes apolares inmiscibles con el agua [31,43].

Todos los extractos independientemente del método a partir del cual se hubieran obtenido, se redisolvieron en acetona acidificada con 1% de ácido acético, ya que se había demostrado en los Capítulos 2 y 3 que era beneficioso para el análisis por GC-MS. De la misma forma se añadieron 50 µl de etilenglicol al 20% en acetona a todos los

extractos antes de concentrarlos a 35°C, ya que se había demostrado en el Capítulo 3 su utilidad para disminuir las pérdidas de algunos herbicidas por evaporación.

Además de adaptar los métodos que ya se habían comparado en el RIKILT, se experimentó una variante del *QuEChERS* denominada *Buffered QuEChERS*, y se extrajeron muestras de paja con todos los métodos para comparar los resultados con los de grano ya que sus composiciones son diferentes.

4.2.5.1. *Buffered QuEChERS*

El método es análogo a *QuEChERS* pero se realiza de tal manera que se genera un tampón durante la extracción a partir del disolvente y la mezcla de sales, lo que permite que los resultados sean homogéneos independientemente del pH de la muestra [39].

Se tomaron las mismas cantidades que en *QuEChERS*, pero el disolvente consistió en 10 ml de acetonitrilo acidificado con 1% de ácido acético. Se agitó manualmente durante 1 min. El NaCl se sustituyó por NaAc, que proporcionaba la sal adecuada para crear el tampón con el ácido acético.

El resto de la experiencia se desarrolló de manera análoga a *QuEChERS*, teniendo en cuenta que había que concentrar los extractos para su análisis.

4.2.5.2. Extracción de Residuos de Herbicidas en Muestras de Paja

La paja de cebada ocupaba más volumen que el grano una vez molida, por lo que fue necesario o bien pesar menos cantidad de muestra, como en el caso del mini Luke y el Acetato de etilo donde se tomaron 2,5 g de paja, o bien utilizar más volumen de disolvente para asegurarse de que la muestra se mojaba bien, como en el caso de la extracción con acetona donde se utilizó el doble que en grano, 30 ml de acetona.

En el caso de *QuEChERS* y *Buffered QuEChERS* se tomaron 2,5 g de muestra y 10 ml de agua para poder mojar bien la muestra aunque el porcentaje de agua fuese mayor del 75 %, por lo que todas las cantidades se calcularon teniendo en cuenta que el peso de muestra era de 12,5 g.

También hubo que aumentar la velocidad de centrifugación de 2500 rpm a 4000 rpm para que el residuo de la paja quedase más compacto y no hubiese problemas al recuperar los extractos. Estos eran más amarillos (o incluso anaranjados) pero sin los precipitados grasientos que aparecían en los del grano, debido a que las muestras de paja contienen menos grasa.

Un resumen de todas las cantidades de muestra y reactivos utilizadas en los diferentes métodos ensayados con los dos tipos de muestras, grano y paja, en ambos laboratorios, se presenta en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resumen de las experiencias llevadas a cabo en el RIKILT y el ITACyL para la comparación de métodos de extracción de residuos de herbicidas en muestras de grano y paja. *cHx*: ciclohexano, *dCM*: diclorometano, *eP*: éter de petróleo, *NaAc*: acetato sódico, *eg*: etilenglicol el 20% en acetona.

Grano (RIKILT)	Muestra	Disolvente	Extracción	Reparto	Limpieza	Sequedad	Análisis
<i>QuEChERS</i>	2,5g + 7,5ml H ₂ O	10ml AcN	1 min agitación manual	4g MgSO ₄ / 1g NaCl	Ácidos: 1ml Básicos/Neutros: 1ml + 25mg PSA / 150mg MgSO ₄		PTV-GC-TOF/MS y LC-ESI-MS/MS
<i>Buf. QuEChERS</i>							
Ac. Etilo	5g + 10ml H ₂ O	50ml AcE	4h agitación orbital		Na ₂ SO ₄ - 25ml - 0,95ml cHx:AcE GPC	10ml 35°C 0,5bar N ₂	
mini Luke	5g + 10ml H ₂ O	20ml Ac	1 min homogenizador	20ml dCM+20ml eP+Na ₂ SO ₄		28ml 35°C 0,5bar N ₂	
Acetona	5g	15ml Ac	1h agitación orbital			10ml 35°C 0,5bar N ₂	
Grano (ITACyL)							
<i>QuEChERS</i>	2,5g + 7,5ml H ₂ O	10ml AcN	1 min agitación manual	4g MgSO ₄ / 1g NaCl	4,5ml ± 100mg PSA / 600mg MgSO ₄	4ml 35°C + eg	GC-MS
<i>Buf. QuEChERS</i>		10ml AcN:1%HAc		4g MgSO ₄ / 1g NaAc			
Ac. Etilo	5g + 10ml H ₂ O	50ml AcE	4h agitación orbital		Na ₂ SO ₄	25ml 35°C + eg	
mini Luke	5g + 10ml H ₂ O	20ml Ac	1 min homogenizador	(pH 2) 20ml dCM+20ml eP+Na ₂ SO ₄		30ml 35°C + eg	
Acetona	5g	15ml Ac	1h agitación orbital			10ml 35°C + eg	
Paja (ITACyL)							
<i>QuEChERS</i>	2,5g + 10ml H ₂ O	12,5ml AcN	1 min agitación manual	5g MgSO ₄ / 1,25g NaCl	4,5ml ± 100mg PSA / 600mg MgSO ₄	4ml 35°C + eg	GC-MS
<i>Buf. QuEChERS</i>		12,5ml AcN:1%HAc		5g MgSO ₄ / 1,25g NaAc			
Ac. Etilo	2,5g + 10ml H ₂ O	50ml AcE	4h agitación orbital		Na ₂ SO ₄	25ml 35°C + eg	
mini Luke	2,5g + 10ml H ₂ O	20ml Ac	1 min homogenizador	(pH 2) 20ml dCM+20ml eP+Na ₂ SO ₄		30ml 35°C + eg	
Acetona	5g	30ml Ac	1h agitación orbital			15ml 35°C + eg	

4.2.6. ANÁLISIS

Durante la estancia en el RIKILT se tuvo la posibilidad de analizar todos los herbicidas aplicables a cebada, por las técnicas PTV-GC-TOF-MS y LC-(ESI)-MS/MS, como ya se detalló en el Capítulo 2. Para ello, se tomaban dos alícuotas del extracto final en todos los métodos. La primera se analizaba tal cual por PTV-GC-TOF-MS, y a la segunda, de 0,25 ml, se le añadían 0,25 ml de agua, se agitaba, y filtraba antes de su análisis por LC-(ESI)-MS/MS.

Para conocer las posibles pérdidas o problemas que pudieran darse durante el procesado de las muestras y el análisis instrumental, se utilizaban dos patrones internos. El primero (Simazina-D5) se añadía cuando se contaminaba la muestra para controlar la extracción, pero en ningún caso se utilizaba para aplicar correcciones. El segundo patrón interno (PCB-198), se añadía al vial en un volumen muy pequeño para no diluir la muestra, justo antes del análisis, para controlar la cantidad de analitos que pasaban a la columna. Las concentraciones de los analitos se deducían a partir de su respuesta relativa a la de este segundo patrón interno.

En el ITACyL se analizaron las muestras por GC-MS y se utilizó el Alacloro como patrón interno, según el método de análisis validado en el Capítulo 2.

En ambos laboratorios, la concentración de los compuestos de estudio se determinaba por comparación de las áreas de los picos en la muestra con las áreas de las mezclas patrones de herbicidas de concentración conocida analizadas en las mismas condiciones. Como se demostrará más adelante, la mayoría de los herbicidas extraídos con los distintos métodos ensayados presentaron efecto matriz, aunque los métodos incluyeran diversas limpiezas. Por tanto, el efecto de la presencia de sustancias en la matriz durante la determinación cromatográfica que afectaba a los analitos produciendo desviaciones, se corregía utilizando calibrados en matriz, para evitar una cuantificación incorrecta, según las recomendaciones de la UE [44], ya detallado en el Capítulo 2. Se preparaba cada nivel del calibrado sobre 900 µl de extractos blancos de muestras de grano o paja extraídos con cada método.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. EXTRACCIONES EN EL RIKILT

4.3.1.1. *QuEChERS*

La evaluación de este método incluye estudios de recuperación de muestras de cebada a 3 niveles: 10, 50 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se escogió el nivel de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para cumplir la legislación europea para alimentos infantiles, la más restrictiva respecto a residuos de plaguicidas (Directiva 2003/13/CE, que modifica la Directiva 96/5/CE). El nivel de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ es el LMR más común para residuos de herbicidas en muestras de cebada (Tabla 4.9). Debe señalarse que el nivel más bajo sólo se hizo por duplicado ya que era una primera aproximación para evaluar la posibilidad de extraer muestras tan poco concentradas con un método que diluía 4 veces el extracto. Para los otros dos niveles se llevaron a cabo 6 réplicas (Tabla 4.2).

Las recuperaciones de los herbicidas no polares (analizados por GC-TOF/MS, Tabla 4.2) en el nivel de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ estaban en el rango de 70-110%, adecuado según las recomendaciones de la UE [44], excepto para los Benzonitrilos (que no se podían detectar bien), el Trialato, el MCPA tioetil y la Terbutrina. Sin embargo, los valores más altos de las recuperaciones obtenidos en este nivel y la falta de precisión para algunos analitos (RSD > 30% [44]), sugerían que al ser un nivel tan poco concentrado se encontraba muy afectado por las interferencias de la matriz.

Sin embargo, los herbicidas de polaridad media (analizados por LC-(ESI+)-MS/MS, Tabla 4.2), mostraron buenas recuperaciones y valores adecuados de precisión. Este comportamiento diferente era resultado del efecto contrario que tenían las interferencias de la matriz en el análisis por GC-TOF/MS y LC-MS/MS.

Todas las recuperaciones medias en los dos niveles más concentrados, 50 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, estaban entre 70–110% para la mayoría de analitos no polares o medianamente polares, disminuyendo para aquellos a los que les afectaban las interferencias de la matriz, como Bromoxinil octanoato, Difenzoquat metil sulfato, Isoproturon e Isoxaben, e incluso para aquellos que no se detectaban bien como MCPA tioetil y Fenclorazol etil. El Florasulam presentaba un aumento de señal muy grande producido también por el efecto matriz. Los analitos ácidos polares (analizados por LC-(ESI-)-MS/MS, Tabla 4.2) tenían recuperaciones medias mayores del 60% para los dos niveles superiores, excepto para Bentazona y Dicamba.

La dispersión de los resultados aumentaba con la concentración y la recuperación era diferente, sobre todo para el nivel menos concentrado. La dispersión era menor en los dos niveles más concentrados, obteniéndose valores de precisión adecuados, excepto para aquellos analitos que se veían afectados por las interferencias de la matriz.

Tabla 4.2. Recuperaciones para muestras blancas de **Grano** contaminadas a 3 niveles de concentración y extraídas mediante el método **QuEChERS (Q)** en el **RIKILT**. Se han subrayado los valores que no cumplen los criterios.

Nº	Herbicida	Análisis	Q	%CV	Q	%CV	Q	%CV
			10ppb	(n=2)	50ppb	(n=6)	250ppb	(n=6)
1	Dicamba	LC-	<u>39,4</u>	17,9	<u>51,0</u>	5,2	<u>60,7</u>	1,7
2	2,4-D	LC-	<u>25,4</u>	12,6	<u>60,0</u>	8,1	<u>60,2</u>	1,7
3	MCPP	LC-	<u>35,2</u>	9,2	<u>65,1</u>	3,7	<u>63,2</u>	4,4
4	Diclorprop p	LC-	<u>36,7</u>	4,4	<u>63,8</u>	7,0	<u>67,5</u>	2,1
5	MCPA	LC-	<u>61,3</u>	5,3	72,9	3,4	<u>69,3</u>	3,3
6	Amidosulfuron	LC+	<u>65,2</u>	6,2	85,8	1,9	83,9	1,2
7	Tribenuron metil	LC+			<u>38,8</u>	4,6	<u>41,2</u>	4,5
8	Fenoxaprop p							
9	Diclofop							
10	Flamprop							
11	Bromoxinil							
12	Ioxinil							
13	Cianazina	LC+	95,0	4,0	119,7	2,3	108,6	1,1
14	Terbutilazina	GC	92,0	3,1	78,9	3,6	73,1	1,5
15	Terbutrina	GC	<u>128,8</u>	18,0	85,4	1,7	76,9	1,6
16	Metribuzina	GC	88,6	<u>39,3</u>	90,2	3,6	83,5	1,9
17	Carfentrazona etil	GC	81,6	10,4	72,0	13,1	76,8	2,9
18	Metoxuron	LC+	<u>29,3</u>	3,3	<u>57,2</u>	7,7	<u>68,8</u>	5,5
19	Isoproturon	LC+			<u>19,3</u>	<u>39,2</u>	<u>49,9</u>	13,7
20	Clortoluron	LC+	<u>41,3</u>	4,7	<u>67,6</u>	5,3	77,2	3,2
21	Metabenzotiazuron	LC+	73,3	1,6	104,3	1,0	100,5	0,8
22	Linuron	LC+	<u>7,8</u>	<u>31,6</u>	<u>61,6</u>	5,6	71,4	3,9
23	Tralkoxidim	LC+	<u>186,8</u>	0,8	114,9	2,0	93,1	6,1
24	Flamprop isopropil	GC	85,4	3,6	85,1	2,4	78,9	1,1
25	Mefenpir dietil	GC	113,0	19,3	82,0	2,0	76,4	1,2
26	MCPA tioetil	GC	<u>37,2</u>	18,2	<u>56,2</u>	9,2	<u>62,0</u>	5,7
27	Bifenox	LC+	90,8	0,1	117,4	4,4	101,6	2,6
28	Fenoxaprop p etil	GC	72,6	<u>46,4</u>	83,9	3,8	80,3	2,1
29	Diclofop metil	GC	73,6	<u>30,0</u>	75,5	6,7	76,3	2,1
30	Prosulfocarb	GC	102,4	1,1	82,5	1,9	74,8	1,7
31	Trialato	GC	<u>122,0</u>	<u>32,5</u>	80,2	2,7	73,4	1,7
32	Diflufenican	GC	84,8	12,7	78,5	3,6	78,0	2,1
33	Pendimetalina	GC	111,8	10,9	84,7	2,6	76,0	2,5
34	Trifluralina	GC	108,6	7,6	81,5	4,2	74,8	1,5
35	MCPP isoecilico							
36	Bromoxinil octanoato	GC			<u>26,7</u>	<u>32,2</u>	<u>38,1</u>	9,3
37	Ioxinil octanoato	GC						
38	Difenzoquat m. sulf.	LC+	<u>30,5</u>	2,5	<u>24,6</u>	<u>20,2</u>	<u>45,7</u>	<u>16,2</u>
39	Clopiralida	LC+						
40	Florasulam	LC+	<u>131,8</u>	2,7	<u>156,0</u>	4,2	<u>135,0</u>	2,5
41	Triasulfuron	LC+	<u>51,2</u>	1,0	76,0	4,0	83,0	3,9
42	Tifensulfuron metil	LC+	75,8	0,3	92,1	1,0	89,3	1,6
43	Imazametabenz metil	LC+	<u>50,8</u>	1,4	75,3	1,2	77,8	2,2
44	Clorsulfuron	LC+	70,7	4,5	92,5	2,1	92,4	1,0
45	Isoxaben	LC+			<u>6,2</u>	<u>104,1</u>	<u>37,4</u>	<u>19,5</u>
46	Fenclorazol etil	LC+	<u>28,9</u>	0,2	<u>38,0</u>	4,2	<u>48,0</u>	4,4
47	Fluroxipir	LC-	<u>47,1</u>	<u>27,7</u>	<u>60,2</u>	4,1	<u>65,6</u>	3,3
48	Bentazona	LC-			<u>44,2</u>	3,5	70,7	5,9
49	Piridato	LC+						
	Crterios		70-120	<20	70-120	<20	70-110	<15

4.3.1.2. Comparación de métodos

Los 4 métodos de extracción se compararon extrayendo muestras blanco de cebada fortificadas a un nivel de 250 µg/kg para los herbicidas de estudio. Se llevaron a cabo 6 réplicas del método *QuEChERS*, mientras que del resto sólo 3.

Los resultados se presentan conjuntamente en la Tabla 4.3. Se examinaron las diferencias significativas aplicando un ANOVA. Los valores representan las medias para las réplicas de los distintos procedimientos, aquellas que van seguidas de letras diferentes en la misma fila presentan diferencias significativas a $p < 0,05$ según el test de Tukey para un número de réplicas diferentes.

La eficiencia en la recuperación de compuestos *No Polares* (analizados por GC-TOF/MS) fue: **mini Luke > acetona > QuEChERS > acetato de etilo**. Todos se recuperaron bien con los 4 procedimientos y fueron precisos (70-120%, CV<15% [44]) para todos estos compuestos, excepto para la Metribuzina y la Pendimetalina por el método mini Luke debido a las interferencias de la matriz. Fue éste el método significativamente más efectivo para la mayoría de estos compuestos, proporcionando recuperaciones medias cercanas al 100%, excepto para la Metribuzina, que no pudo deconvolucionarse bien debido a las interferencias de la matriz. Las recuperaciones fueron menores con la acetona ya que no utilizaba disolventes apolares.

El método *QuEChERS* presentó recuperaciones en torno al 70%, siendo los hidroxibenzonitrilos los menos extraídos, como el Bromoxinil octanoato, o completamente perdidos, como el Ioxinil octanoato, debido a las interferencias de la matriz que dificultaban la detección.

El método del acetato de etilo fue significativamente el menos eficiente de todos, con valores ligeramente menores que *QuEChERS*, sobre todo para la Trifluralina y la Carfentrazona etil debido a que ambos herbicidas son muy volátiles y este método era el único que concentraba dos veces el extracto. De hecho, se cree que el acetato de etilo extraía adecuadamente la mayoría de herbicidas, pero algunos se perdían en el proceso de limpieza por GPC, y otros en la doble evaporación del disolvente. Se ha encontrado en la bibliografía que los herbicidas con grupos tioéter se degradan en acetato de etilo [11], pero no se observó tal efecto.

Como conclusión puede decirse que la extracción de compuestos no polares se incrementaba cuando no se aplicaban etapas de limpieza y cuando se utilizaba el reparto con disolventes apolares.

La eficiencia en la recuperación de *Herbicidas Ácidos* (analizados por LC-(ESI)-MS/MS) fue: **QuEChERS = acetato de etilo > mini Luke > acetona**, contraria a la de los apolares. Ningún procedimiento pudo recuperar adecuadamente estos herbicidas, produciendo recuperaciones menores o ligeramente superiores al 70%, que aumentaban a medida que disminuía la acidez de los analitos. *QuEChERS* fue el más efectivo para los analitos más ácidos, Dicamba y 2,4-D, y con mejor precisión comparado con el método del acetato de etilo, lo que demuestra que el acetonitrilo se separaba más fácilmente del agua con la adición de una mezcla de sales apropiadas sin necesidad del reparto con disolventes apolares al mismo tiempo que recuperaba grandes cantidades de plaguicidas, incluyendo los polares [11]. Las extracciones con *QuEChERS* y con acetato de etilo fueron más eficientes que el mini Luke, como se esperaba [19], ya que los compuestos más polares quedaban en la fase acuosa. Sin embargo, las recuperaciones fueron mayores que en la extracción con acetona, demostrando que una única etapa de extracción con un disolvente orgánico no era adecuada para extraer este tipo de compuestos.

La eficiencia en la recuperación de compuestos de *Polaridad Media* (analizados por LC-(ESI+)-MS/MS), no tenía una tendencia tan clara como los compuestos anteriores. El mini Luke era el método que proporcionaba mayores recuperaciones frente a los otros tres siendo además el único capaz de extraer la Clopiralida, lo que sugería que el reparto con disolventes no polares era más efectivo para extraer analitos de polaridad media que la adición de sales o las extracciones con disolventes en una única etapa. Algunos herbicidas mostraron buenas recuperaciones con todos los métodos, excepto para el acetato de etilo, ya que podían haberse perdido en la limpieza por GPC. En general, las recuperaciones de los analitos de polaridad media fueron mayores del 60% aunque hubo excepciones en todos los métodos, especialmente para *QuEChERS* con valores en torno al 45% para algunos analitos. El Piridato se perdió en los extractos de *QuEChERS* debido a las interferencias de la matriz. De todas formas, es el único herbicida que no ha podido validarse por este método en los estudios que se han desarrollado [45], ya que es un analito muy polar e inestable [46].

4.3.1.3. Evaluación del Efecto Matriz

La linealidad de los procedimientos analíticos se estudió con 5 repeticiones de calibrados preparados en extractos blancos de grano extraídos con los 4 métodos.

Se obtuvieron calibrados lineales (Tabla 4.4) para todos los compuestos analizados con GC-TOF/MS y LC-MS/MS en todo el rango experimentado (2,5-100 µg/l) a 4 niveles, excepto para el Piridato con *QuEChERS*, y la Clopiralida con mini Luke o acetona, debido a las interferencias de la matriz. Algunos herbicidas tenían coeficientes de linealidad ligeramente menores del 95%, para los métodos que no incluían un paso de limpieza, mini Luke y acetona. Únicamente se calcularon los LD y CV del factor de respuesta para los calibrados en *QuEChERS*. Los valores de t se calcularon a un nivel de $\alpha=0,05$ y dos grados de libertad, $t_{teórico}=4,303$.

Con el método *QuEChERS* se obtuvieron extractos más limpios debido a que el acetonitrilo extraía menos co-extractos lipofílicos en comparación con la acetona o el acetato de etilo, la adición del NaCl controlaba la cantidad de componentes de la matriz extraídos y se retenían ácidos grasos y otros ácidos orgánicos en la limpieza con PSA. El acetato de etilo era más efectivo en impedir la extracción de azúcares, pero también extraía más interferencias de la matriz, sobre todo comparado con la acetona, por eso se hacía necesario introducir la limpieza con GPC para proporcionar extractos más limpios. El reparto de la acetona con el diclorometano y el éter de petróleo se ha descrito como el más selectivo para disminuir los co-extractos polares [13], pero no se observaron diferencias al compararlo con los extractos obtenidos a partir de la acetona sin reparto. La desviación de las pendientes de la unidad se puede tomar como una medida del efecto matriz. En este sentido, se observa que compuestos con pendientes cercanas a 1 en los extractos de *QuEChERS* y del acetato de etilo, mostraban valores de la pendiente muy distintos de este valor con acetona o mini Luke, es decir, los procedimientos que no incluían la limpieza del extracto.

Tabla 4.3. Recuperaciones y coeficientes de variación para muestras blancas de **Grano** contaminadas con 250 µg kg⁻¹ y extraídas con los 4 procedimientos en el **RIKILT**. Se han subrayado los valores que no cumplen los criterios.

Nº	Herbicida	Q 250ppb	%CV (n=6)	AcE 250ppb	%CV (n=3)	mL 250ppb	%CV (n=3)	Ac 250ppb	%CV (n=3)
1	Dicamba	<u>60,7a</u>	1,7	<u>13,1c</u>	<u>40,3</u>	<u>27,2b</u>	<u>17,0</u>	<u>15,7c</u>	13,1
2	2,4-D	<u>60,2a</u>	1,7	<u>40,3b</u>	<u>28,5</u>	<u>41,5b</u>	6,0	<u>30,5b</u>	5,9
3	MCP	<u>63,2b</u>	4,4	77,0a	5,6	77,1a	4,8	<u>55,6b</u>	9,8
4	Diclorprop p	<u>67,5ab</u>	2,1	74,2a	5,8	<u>62,9b</u>	5,9	<u>45,8c</u>	5,7
5	MCPA	<u>69,3b</u>	3,3	79,4a	4,9	<u>65,2b</u>	5,3	<u>41,0c</u>	8,0
6	Amidosulfuron	83,9b	1,2	75,7c	4,6	97,0a	6,1	<u>67,5d</u>	3,7
7	Tribenuron metil	<u>41,2d</u>	4,5	71,2c	3,9	100,8a	3,2	82,4b	2,1
8	Fenoxaprop p								
9	Diclofop								
10	Flamprop								
11	Bromoxinil								
12	Ioxinil								
13	Cianazina	108,6b	1,1	77,2d	5,4	<u>118,8a</u>	4,5	85,1c	1,1
14	Terbutilazina	73,1c	1,5	83,5b	9,1	100,0a	1,4	77,2bc	3,4
15	Terbutrina	76,9a	1,6	85,1a	8,0	85,9a	1,7	82,2a	10,8
16	Metribuzina	83,5a	1,9	75,2a	3,5	<u>57,8b</u>	<u>20,7</u>	88,0a	2,8
17	Carfentrazona etil	76,8c	2,9			<u>113,3a</u>	3,1	99,3b	3,2
18	Metoxuron	<u>68,8b</u>	5,5	<u>68,0b</u>	5,4	82,3a	3,1	71,7b	3,4
19	Isoproturon	<u>49,9c</u>	13,7	<u>68,2b</u>	4,1	75,0ab	2,1	82,6a	5,8
20	Clortoluron	77,2c	3,2	<u>68,4b</u>	4,2	84,9a	2,2	76,5c	3,7
21	Metabenzotiazuron	100,5b	0,8	90,8c	4,0	<u>112,6a</u>	4,6	85,0c	1,5
22	Linuron	71,4b	3,9	74,7b	3,5	88,7a	0,2	83,9a	3,7
23	Tralkoxidim	93,1c	6,1	95,5c	0,8	<u>121,8a</u>	1,6	104,8b	3,3
24	Flamprop isopropil	78,9bc	1,1	72,6c	6,5	97,6a	2,8	81,3b	3,7
25	Mefenpir dietil	76,4c	1,2	<u>67,0c</u>	4,4	<u>117,4a</u>	7,0	89,9b	8,6
26	MCPA tioetil	<u>62,0c</u>	5,7	<u>58,9c</u>	5,8	100,4a	1,3	75,7b	4,3
27	Bifenox	101,6b	2,6	86,5c	6,5	<u>120,4a</u>	3,2	96,1b	2,8
28	Fenoxaprop p etil	80,3c	2,1	<u>60,6d</u>	9,8	107,7b	5,0	<u>117,8a</u>	1,6
29	Diclofop metil	76,3c	2,1	75,6c	8,6	<u>115,5a</u>	0,7	93,2b	5,6
30	Prosulfocarb	74,8b	1,7	78,5b	8,3	101,1a	3,4	81,1b	4,0
31	Triallato	73,4bc	1,7	<u>68,2c</u>	9,1	96,6a	1,4	79,9b	2,5
32	Diflufenican	78,0c	2,1	74,1c	7,4	109,0a	3,3	87,6b	3,8
33	Pendimetalina	76,0b	2,5	73,8b	8,2	<u>111,2a</u>	<u>18,0</u>	104,9a	0,9
34	Trifluralina	74,8b	1,5	<u>31,3c</u>	10,9	89,6a	2,6	79,0b	3,8
35	MCP isoocílico								
36	Bromoxinil oct.	<u>38,1c</u>	9,3	79,5b	9,0	<u>118,7a</u>	9,2	77,3b	2,8
37	Ioxinil octanoato			72,9c	9,6	<u>180,7a</u>	5,5	103,3b	5,7
38	Difenzoquat m. sulf.	<u>45,7b</u>	<u>16,2</u>	<u>1,4c</u>	3,8	<u>62,6a</u>	3,4	<u>38,2b</u>	4,2
39	Clopiralida					<u>50,9a</u>	<u>19,7</u>		
40	Florasulam	<u>135,0a</u>	2,5	<u>0,6c</u>	2,1	<u>140,9a</u>	5,8	102,0b	1,5
41	Triasulfuron	83,0b	3,9	78,7bc	4,0	96,3a	2,7	71,8c	2,2
42	Tifensulfuron metil	89,3a	1,6	71,4b	4,6	93,4a	3,0	<u>57,9c</u>	4,4
43	Imazametabenz met.	77,8b	2,2	74,5b	4,6	89,6a	1,8	74,1b	3,0
44	Clorsulfuron	92,4b	1,0	84,8c	4,6	99,4a	3,6	<u>61,3d</u>	5,5
45	Isoxaben	<u>37,4c</u>	<u>19,5</u>	<u>60,4b</u>	5,9	<u>65,8b</u>	4,1	87,4a	7,1
46	Fenclorazol etil	<u>48,0c</u>	4,4	<u>56,7b</u>	6,9	75,3a	1,2	79,3a	2,8
47	Fluroxipir	<u>65,6a</u>	3,3	<u>66,5a</u>	3,7	<u>39,0b</u>	10,1	<u>26,7c</u>	6,1
48	Bentazona	70,7ab	5,9	75,4a	3,9	<u>60,4b</u>	10,7	<u>69,3ab</u>	4,6
49	Piridato			<u>62,3c</u>	9,9	84,4b	2,1	<u>120,4a</u>	5,4
	Criterios	70-110	<15	70-110	<15	70-110	<15	70-110	<15

Tabla 4.4. Parámetros de linealidad, LD y presencia del efecto matriz (datos subrayados) para los calibrados en matriz preparados sobre extractos blancos de **Grano** extraídos con los 4 métodos en el **RIKILT**. b representa la pendiente y Sb su desviación (test de ajuste a una línea).

Nº	Herbicida	<i>QuEChERS</i>					AcE			mini Luke			Ac		
		CV fr	LD	Cf. Lin.	b	± t*Sb	Cf. Lin.	b	± t*Sb	Cf. Lin.	b	± t*Sb	Cf. Lin.	b	± t*Sb
1	Dicamba	4,9	1,2	98,5	<u>0,72</u>	<u>0,27</u>	96,7	0,89	0,48	98,5	<u>0,56</u>	<u>0,19</u>	95,3	<u>0,78</u>	<u>0,20</u>
2	2,4-D	12,2	0,2	99,8	0,98	0,03	98,9	<u>1,38</u>	<u>0,09</u>	98,0	1,04	0,09	98,0	<u>1,09</u>	<u>0,09</u>
3	MCP	6,7	2,0	97,5	0,96	0,11	98,1	1,00	0,19	95,5	0,98	0,14	94,7	1,05	0,17
4	Diclorprop p	9,2	1,4	98,3	0,93	0,08	97,7	<u>1,18</u>	<u>0,15</u>	96,4	0,98	0,16	97,7	1,07	0,11
5	MCPA	6,1	0,9	98,8	0,96	0,09	97,3	1,13	0,27	97,5	<u>0,92</u>	<u>0,07</u>	96,7	<u>1,13</u>	<u>0,12</u>
6	Amidosulfuron	2,1	1,4	98,2	0,98	0,10	98,8	0,99	0,03	98,6	<u>0,85</u>	<u>0,04</u>	99,7	<u>1,14</u>	<u>0,04</u>
7	Tribenuron m.	4,0	2,1	97,4	<u>0,67</u>	<u>0,07</u>	98,9	<u>0,68</u>	<u>0,04</u>	97,8	<u>0,56</u>	<u>0,06</u>	99,5	<u>1,51</u>	<u>0,02</u>
8	Fenoxaprop p														
9	Diclofop														
10	Flamprop														
11	Bromoxinil														
12	Ioxinil														
13	Cianazina	2,5	2,2	97,2	<u>0,68</u>	<u>0,10</u>	99,7	<u>1,44</u>	<u>0,03</u>	99,5	<u>1,51</u>	<u>0,02</u>	99,0	<u>0,74</u>	<u>0,01</u>
14	Terbutilazina	8,4	1,7	97,9	<u>1,13</u>	<u>0,08</u>	99,1	<u>1,09</u>	<u>0,06</u>	99,7	<u>0,88</u>	<u>0,02</u>	96,5	1,09	0,17
15	Terbutrina	10,3	1,0	98,8	<u>1,21</u>	<u>0,08</u>	99,5	<u>1,07</u>	<u>0,02</u>	94,4	<u>0,20</u>	<u>0,04</u>	94,4	<u>0,41</u>	<u>0,08</u>
16	Metribuzina	3,1	1,8	97,7	1,00	0,11	99,2	<u>1,03</u>	<u>0,02</u>	91,0	<u>0,46</u>	<u>0,17</u>	98,9	<u>1,19</u>	<u>0,05</u>
17	Carfentraz. et.	12,5	1,8	97,7	<u>1,13</u>	<u>0,07</u>	98,8	<u>1,31</u>	<u>0,06</u>	98,2	<u>1,29</u>	<u>0,09</u>	96,6	<u>1,35</u>	<u>0,17</u>
18	Metoxuron	4,0	2,1	97,4	<u>1,46</u>	<u>0,06</u>	99,7	<u>0,56</u>	<u>0,03</u>	99,0	<u>0,64</u>	<u>0,07</u>	97,8	<u>1,67</u>	<u>0,04</u>
19	Isoproturon	6,9	2,3	97,1	<u>2,92</u>	<u>0,48</u>	97,4	<u>3,83</u>	<u>0,65</u>	99,4	<u>0,33</u>	<u>0,09</u>	94,8	<u>3,51</u>	<u>0,32</u>
20	Clortoluron	2,9	2,0	97,4	<u>1,13</u>	<u>0,07</u>	99,6	<u>0,62</u>	<u>0,02</u>	99,0	<u>1,30</u>	<u>0,12</u>	97,4	<u>1,58</u>	<u>0,09</u>
21	Metabenzot.	3,2	2,3	97,1	<u>0,61</u>	<u>0,07</u>	99,7	<u>1,48</u>	<u>0,02</u>	99,7	<u>1,68</u>	<u>0,02</u>	99,8	<u>1,38</u>	<u>0,02</u>
22	Linuron	5,6	3,0	96,2	<u>1,11</u>	<u>0,10</u>	98,5	<u>1,41</u>	<u>0,01</u>	99,2	<u>0,92</u>	<u>0,04</u>	97,4	<u>1,32</u>	<u>0,06</u>
23	Tralkoxidim	8,3	3,3	95,9	<u>1,52</u>	<u>0,12</u>	97,3	<u>1,34</u>	<u>0,04</u>	97,5	<u>1,62</u>	<u>0,04</u>	95,7	<u>0,70</u>	<u>0,15</u>
24	Flamprop isop.	9,2	1,1	98,7	<u>1,19</u>	<u>0,04</u>	99,6	<u>0,91</u>	<u>0,03</u>	99,6	<u>1,21</u>	<u>0,05</u>	98,4	<u>1,26</u>	<u>0,11</u>
25	Mefenpir dietil	14,3	1,7	97,9	<u>1,06</u>	<u>0,05</u>	99,0	<u>1,08</u>	<u>0,03</u>	98,6	<u>0,77</u>	<u>0,05</u>	97,5	0,92	0,09
26	MCPA tioetil	12,7	1,2	98,5	<u>1,11</u>	<u>0,08</u>	99,4	<u>0,88</u>	<u>0,03</u>	99,1	<u>1,19</u>	<u>0,08</u>	98,5	<u>1,18</u>	<u>0,11</u>
27	Bifenox	14,2	2,8	96,4	<u>0,46</u>	<u>0,10</u>	98,2	<u>1,52</u>	<u>0,03</u>	99,1	<u>2,54</u>	<u>0,20</u>	98,6	<u>1,69</u>	<u>0,02</u>
28	Fenoxaprop p e.	12,8	2,3	97,1	<u>1,27</u>	<u>0,03</u>	98,0	1,02	0,16	98,8	<u>2,33</u>	<u>0,39</u>	98,6	<u>1,64</u>	<u>0,28</u>
29	Diclofop metil	7,8	1,4	98,2	<u>1,04</u>	<u>0,02</u>	98,6	1,03	0,09	98,9	<u>0,83</u>	<u>0,00</u>	99,2	<u>1,02</u>	<u>0,01</u>
30	Prosulfocarb	3,9	1,5	98,1	<u>1,18</u>	<u>0,13</u>	99,1	<u>1,01</u>	<u>0,05</u>	99,1	<u>1,16</u>	<u>0,04</u>	96,1	1,10	0,20
31	Trialato	5,1	2,2	97,2	<u>1,16</u>	<u>0,16</u>	99,6	<u>0,94</u>	<u>0,03</u>	99,2	<u>0,84</u>	<u>0,07</u>	99,1	<u>0,87</u>	<u>0,07</u>
32	Diflufenican	10,6	1,1	98,6	<u>1,11</u>	<u>0,04</u>	99,1	0,95	0,10	99,6	<u>1,10</u>	<u>0,09</u>	98,4	0,97	0,14
33	Pendimetalina	4,2	2,1	97,3	<u>1,15</u>	<u>0,08</u>	98,8	<u>1,07</u>	<u>0,06</u>	95,5	<u>0,38</u>	<u>0,06</u>	95,7	<u>0,68</u>	<u>0,13</u>
34	Trifluralina	3,5	1,9	97,6	1,11	0,12	98,8	<u>1,11</u>	<u>0,09</u>	99,3	<u>1,18</u>	<u>0,07</u>	98,1	<u>1,14</u>	<u>0,12</u>
35	MCP isooc.														
36	Bromoxinil oct.	7,1	1,1	98,2	1,33	0,36	99,0	<u>0,66</u>	<u>0,11</u>	98,7	0,58	0,50	96,7	<u>2,28</u>	<u>0,17</u>
37	Ioxinil oct.						98,2	<u>0,80</u>	<u>0,16</u>	98,1	<u>1,26</u>	<u>0,29</u>	97,0	<u>0,80</u>	<u>0,40</u>
38	Difenzoq. m. s.	6,2	1,3	98,3	<u>12,72</u>	<u>1,42</u>	98,2	<u>4,60</u>	<u>1,19</u>	98,6	<u>6,21</u>	<u>1,46</u>	97,9	<u>5,55</u>	<u>0,53</u>
39	Clopiralida	1,9	3,4	97,2	<u>0,19</u>	<u>0,02</u>	99,8	<u>2,15</u>	<u>0,14</u>	79,7	<u>0,09</u>	<u>0,06</u>	74,7	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>
40	Florasulam	3,2	2,6	96,7	<u>0,49</u>	<u>0,09</u>	99,7	<u>1,83</u>	<u>0,07</u>	98,7	<u>2,01</u>	<u>0,22</u>	99,6	<u>2,07</u>	<u>0,07</u>
41	Triasulfuron	2,8	1,7	97,8	<u>1,35</u>	<u>0,11</u>	99,3	<u>1,35</u>	<u>0,06</u>	99,2	<u>1,31</u>	<u>0,07</u>	98,6	<u>1,21</u>	<u>0,09</u>
42	Tifensulfur. m.	3,4	2,0	97,5	1,05	0,12	99,4	<u>1,03</u>	<u>0,02</u>	99,3	1,02	0,02	99,8	<u>1,06</u>	<u>0,01</u>
43	Imazamet. m.	2,5	1,8	97,7	<u>1,10</u>	<u>0,09</u>	99,8	<u>0,81</u>	<u>0,02</u>	99,1	<u>1,15</u>	<u>0,07</u>	98,0	<u>1,16</u>	<u>0,08</u>
44	Clorsulfuron	2,3	1,1	98,6	0,91	0,09	99,6	<u>1,08</u>	<u>0,04</u>	99,8	<u>1,16</u>	<u>0,04</u>	99,3	<u>1,09</u>	<u>0,07</u>
45	Isoxaben	7,1	2,8	96,5	<u>5,58</u>	<u>1,25</u>	96,0	<u>7,68</u>	<u>1,51</u>	99,1	<u>0,18</u>	<u>0,06</u>	92,8	<u>6,81</u>	<u>0,95</u>
46	Fenclorazol etil	5,3	1,2	98,5	<u>0,66</u>	<u>0,06</u>	99,9	<u>0,76</u>	<u>0,02</u>	98,7	<u>0,62</u>	<u>0,02</u>	99,2	<u>0,94</u>	<u>0,06</u>
47	Fluroxipir	16,8	23	98,4	1,05	0,16	99,2	<u>0,71</u>	<u>0,04</u>	99,8	0,94	0,08	98,1	<u>1,48</u>	<u>0,25</u>
48	Bentazona	13,1	1,2	94,1	<u>1,13</u>	<u>0,11</u>	94,0	<u>1,48</u>	<u>0,16</u>	95,4	<u>1,30</u>	<u>0,08</u>	92,3	<u>1,35</u>	<u>0,13</u>
49	Piridato	10,7	4,7	70,5	<u>0,35</u>	<u>0,38</u>	95,6	<u>1,39</u>	<u>0,01</u>	97,1	<u>1,55</u>	<u>0,14</u>	94,8	<u>1,57</u>	<u>0,20</u>

Las interferencias que co-eluían afectaban a los análisis por GC-TOF/MS de dos maneras muy diferentes. Algunas no permitían la correcta deconvolución de los picos que producían menores respuestas o por el contrario éstas se incrementaban. Sin embargo, la inclusión de una etapa de limpieza era lo suficientemente efectiva de tal manera que sólo el Bromoxinil octanoato y el Ioxinil octanoato se deconvolucionaban mal en *QuEChERS*. De todas formas, los herbicidas Benzotriilos no se analizaban adecuadamente por GC-TOF/MS debido a que su ión cuantificador (127 m/z) no era lo suficientemente específico, no había otros iones lo suficientemente abundantes que pudieran usarse para cuantificar, estaban muy afectados por las interferencias de la matriz, y eran retenidos en el *liner* empacado de la inyección PTV.

Una desventaja de LC-MS/MS cuando se usan fuentes de electrospray y se trabaja con extractos sin limpiar de matrices complejas, es que las interferencias de la matriz producen un efecto sobre los analitos, a veces inhiben la señal y otras veces la incrementan, lo que produce cuantificaciones erróneas. La mayoría de compuestos experimentaron un incremento en la señal en todos los métodos de extracción (con o sin limpieza), lo que sugiere que la ionización por electrospray estaba afectada por la presencia de la matriz, independientemente de la cantidad de co-extractos. Además se observaron desviaciones de las pendientes de la unidad para todos los extractos y analitos comparándolo con el análisis por GC. Podría pensarse en eliminar las etapas de limpieza cuando los extractos eran analizados por LC-MS/MS porque no conseguían evitar el incremento de la señal, pero los beneficios que producían en el análisis por GC-TOF/MS y la necesidad de un menor mantenimiento de los equipos, animan a su inclusión en los métodos de extracción siempre que se obtengan buenas recuperaciones.

Se estimó el LD a partir de muestras de grano contaminadas y extraídas con el método *QuEChERS*, basándonos en una relación señal/ruido de 3:1. Los valores fueron ligeramente menores que el límite deseado (2,5 µg/kg) para todos los herbicidas, excepto para el Florasulam, Isoxaben, Linuron, Bifenox, Tralkoxidim, y Bentazona. Se encontró para el Piridato, un valor inusualmente elevado de 23,2 µg/kg, confirmando que se veía fuertemente afectado por las interferencias de la matriz y no se podía analizar convenientemente (Tabla 4.4).

4.3.2. ADAPTACIÓN DE MÉTODOS EN EL ITACyL

4.3.2.1. Comparación de Métodos

Se compararon los resultados obtenidos en el RIKILT con los obtenidos en el ITACyL para la extracción de muestras de grano contaminadas al mismo nivel y extraídas con los mismos métodos, teniendo en cuenta los cambios hechos para poder adaptar los métodos al equipamiento disponible. Se apreció la misma tendencia en la recuperación de los analitos en función de su polaridad observada en el RIKILT (Figura 4.9).

Los datos que aparecen en las tablas pertenecientes a los herbicidas ácidos (compuestos del 1-12) extraídos por *QuEChERS*, son los correspondientes a los extractos donde no se llevó a cabo la limpieza con PSA, mientras que los pertenecientes a los herbicidas básicos y neutros (compuestos del 13-37) si la incluyen. Análogamente los datos para los herbicidas ácidos extraídos por el método mini Luke se han realizado con acidificación antes del reparto, mientras que los básicos y neutros se repartieron sin ajuste de pH.

En GC-MS no existían los problemas derivados de la mala deconvolución de algunos picos como con el TOF-MS, ni se quedaban atrapados en el *liner* del PTV, así que

herbicidas que no se analizaban bien por estas técnicas, como los Benzonitrilos (Bromoxinil e Ioxinil octanoato), se analizaron sin problemas con el cuadrupolo en todos los métodos (Figura 4.9).

A su vez se observaba que las recuperaciones obtenidas para los herbicidas ácidos en el ITACyL eran análogas a las obtenidas en el RIKILT, por lo que el análisis de los ésteres metílicos por GC para los ácidos, en lugar del uso de LC-(ESI)-MS/MS, era válido (Figura 4.9).

El principal inconveniente que se encontró para llevar a cabo el método *QuEChERS* era que las muestras debían concentrarse porque no se podían inyectar grandes volúmenes en GC. Debido a esto, las recuperaciones fueron algo menores para los herbicidas más apolares, los más volátiles, aunque el uso del etilenglicol y las bajas temperaturas al concentrar hacían que estas diferencias no fueran muy grandes respecto de los resultados obtenidos en el RIKILT. Las recuperaciones medias obtenidas estaban en torno al 70%, lo cual demostraba que aunque se trataba de un método de extracción muy simple, la adición de modificadores orgánicos y sales aumentaban las recuperaciones de analitos de muy diferentes características [33,47].

Se comprobaba que las bajas recuperaciones de analitos neutros y básicos con el método del *Acetato de etilo*, eran debidas a pérdidas que se producían al limpiar la muestra por GPC y al evaporar dos veces los extractos, porque en el método desarrollado en el ITACyL las recuperaciones fueron cercanas al 100%. Sin embargo, los herbicidas ácidos se perdían en la fase acuosa al no mezclarse bien con el acetato de etilo.

El método *mini Luke* junto con el del Acetato de etilo, fueron los que proporcionaron mayores recuperaciones para los herbicidas neutros y básicos frente a *QuEChERS* y la extracción con acetona, lo que sugiere que el reparto con disolventes no polares y la extracción con un disolvente poco miscible con el agua, como el acetato de etilo, eran más eficaces que la adición de sales o las extracciones con disolventes polares en una única etapa. El ajuste de pH a 2 antes del reparto proporcionó muy buenas recuperaciones para los herbicidas ácidos.

La extracción con *acetona* proporcionó menores recuperaciones para los analitos poco polares ya que no se utilizaban disolventes apolares, pero, en general los resultados obtenidos para herbicidas de polaridad media eran satisfactorios, ya que al aumentar la polaridad del disolvente aumentaban las recuperaciones de analitos polares [31]. Además, su punto de ebullición era el menor de todos los disolventes utilizados, y, por tanto, minimizaba las pérdidas por evaporación.

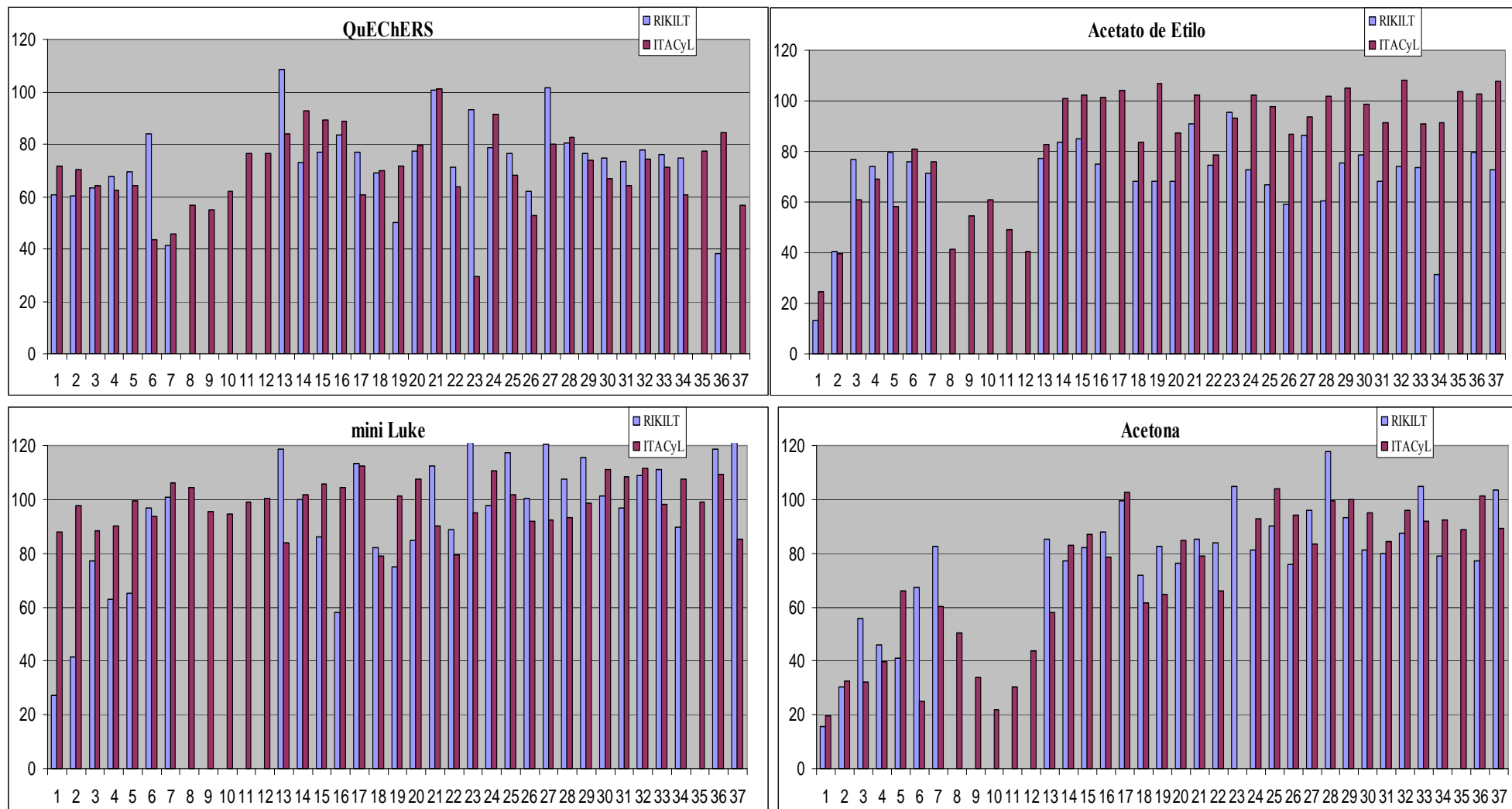


Figura 4.9. Comparación de las recuperaciones obtenidas con los 4 métodos en muestras de **Grano** contaminadas a $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ en el RIKILT y en el ITACyL. Los herbicidas se han numerado como en las tablas.

Tabla 4.5. Recuperaciones y coeficientes de variación para muestras blancas de **Grano** contaminadas con 250 µg kg⁻¹ y extraídas con los 4 procedimientos en el **ITACyL**. Se han subrayado los valores que no cumplen los criterios.

Nº	Herbicida	Q 250ppb	%CV (n=5)	AcE 250ppb	%CV (n=5)	mL 250ppb	%CV (n=5)	Ac 250ppb	%CV (n=5)
1	Dicamba	71,5b	1,9	<u>24,4c</u>	4,8	88,0a	5,7	<u>19,4c</u>	4,6
2	2,4-D	70,2b	7,9	<u>39,4c</u>	8,6	97,8a	10,9	<u>32,7c</u>	4,2
3	MCPPP	<u>64,2b</u>	10,7	<u>60,7b</u>	5,3	88,2a	8,2	<u>32,1c</u>	3,4
4	Diclorprop p	<u>62,6b</u>	3,0	<u>68,9b</u>	6,8	90,0a	6,5	<u>39,8c</u>	3,1
5	MCPA	<u>64,1b</u>	7,7	<u>58,2c</u>	4,6	99,3a	10,4	<u>66,1b</u>	0,6
6	Amidosulfuron	<u>43,6c</u>	<u>16,4</u>	80,8b	4,7	93,5a	7,8	<u>25,0d</u>	8,2
7	Tribenuron metil	<u>45,8d</u>	13,9	76,0b	4,7	106,2a	7,4	<u>60,2c</u>	14,0
8	Fenoxaprop p	<u>56,6b</u>	15,0	<u>41,2c</u>	9,9	104,2a	6,1	<u>50,4bc</u>	6,7
9	Diclofop	<u>55,0b</u>	8,5	<u>54,6b</u>	3,8	95,3a	8,5	<u>33,7c</u>	6,2
10	Flamprop	<u>62,0b</u>	0,5	<u>61,0b</u>	8,1	94,5a	4,5	<u>22,0c</u>	7,2
11	Bromoxinil	76,6b	9,1	<u>48,9c</u>	3,0	99,0a	6,0	<u>30,4d</u>	2,5
12	Ioxinil	76,3b	5,6	<u>40,3c</u>	4,6	100,5a	9,2	<u>43,9c</u>	1,7
13	Cianazina	83,8a	11,7	82,9a	<u>15,4</u>	84,1a	11,3	<u>58,2b</u>	12,1
14	Terbutilazina	92,8b	4,4	100,7a	3,4	101,6a	8,7	82,9c	4,9
15	Terbutrina	89,4b	6,9	102,4a	4,2	105,8a	4,3	86,8b	5,9
16	Metribuzina	89,0b	6,6	101,3a	2,4	104,5a	1,8	78,3c	6,7
17	Carfentrazona etil	<u>60,6c</u>	14,7	104,0b	1,4	<u>112,6ab</u>	0,7	102,8b	<u>15,7</u>
18	Metoxuron	<u>69,9c</u>	9,9	83,8a	3,2	78,9b	2,3	<u>61,4c</u>	12,2
19	Isoproturon	71,8bc	3,5	107,0a	4,1	101,1a	3,6	<u>64,6c</u>	11,4
20	Clortoluron	79,5c	5,4	87,1b	6,4	107,7a	7,7	84,6bc	16,2
21	Metabenzotiazuron	101,1a	15,5	102,4a	5,0	90,3b	3,2	79,1c	6,8
22	Linuron	<u>63,8b</u>	<u>16,8</u>	78,8a	9,6	79,3a	7,0	<u>66,0b</u>	6,4
23	Tralkoxidim	<u>29,4b</u>	13,6	93,2a	7,5	95,1a	5,9		
24	Flamprop isopropil	91,3b	6,5	102,3ab	7,0	<u>110,8a</u>	2,5	92,7b	7,6
25	Mefenpir dietil	<u>68,3c</u>	3,8	97,8b	7,5	101,7ab	2,6	104,1a	4,8
26	MCPA tioetil	<u>52,7c</u>	7,2	86,9b	6,2	92,1a	1,5	94,0a	1,7
27	Bifenox	80,2b	9,5	93,7a	4,5	92,3a	7,9	83,5b	12,9
28	Fenoxaprop p etil	82,4c	0,6	101,9a	9,0	93,4b	4,3	99,3ab	6,3
29	Diclofop metil	73,9c	2,2	105,0a	7,8	98,7b	2,9	99,8ab	5,1
30	Prosulfocarb	<u>67,0c</u>	6,5	98,5ab	3,1	<u>111,3a</u>	3,9	94,8b	1,5
31	Trialato	<u>64,4d</u>	10,3	91,5bc	8,2	108,5a	6,7	84,5c	4,2
32	Diflufenican	74,5c	4,3	108,4a	6,6	<u>111,4a</u>	2,2	95,8b	8,4
33	Pendimetalina	71,0c	5,6	91,0b	6,3	98,4a	1,9	92,1ab	2,0
34	Trifluralina	<u>60,7c</u>	5,6	91,3b	8,7	107,3a	2,9	92,3b	1,6
35	MCPPP isoocílico	77,5c	3,7	103,7a	5,8	99,2a	0,6	88,7b	5,8
36	Bromoxinil oct.	84,4b	5,4	102,9a	5,2	109,5a	11,2	101,1a	12,0
37	Ioxinil octanoato	<u>56,7c</u>	3,8	107,7a	14,8	85,0b	1,6	89,3b	9,1
	Criterios	70-110	< 15	70-110	< 15	70-110	< 15	70-110	< 15

Evaluación del Efecto Matriz

La linealidad de los procedimientos analíticos se estudió con 5 repeticiones de calibrados preparados en extractos blancos de grano extraídos con los diferentes métodos teniendo en cuenta las adaptaciones realizadas en el ITACyL.

Se obtuvieron calibrados lineales (Tabla 4.6) para todos los compuestos analizados con GC-MS en todo el rango experimentado (10-500 µg/l) a 6 niveles, análogo a suelos, excepto para la mayoría de analitos extraídos con acetona debido a que no incluía el reparto que eliminaba las interferencias polares de la matriz que co-eluían.

Paradójicamente se obtuvieron valores de los coeficientes de linealidad ligeramente inferiores al 95% para muchos de los analitos neutros en el caso de *QuEChERS* y mini Luke, procedimientos que contaban con limpieza, mientras que la linealidad era mejor para la extracción con Acetato de etilo, en la que no se limpiaban los extractos.

Tabla 4.6. Linealidad y Efecto matriz (datos subrayados) para los calibrados en matriz preparados sobre extractos blancos de **Grano** extraídos con los 4 métodos en el **ITACyL**.

Nº	Herbicida	<i>QuEChERS</i>			Acetato de Etilo			Mini Luke			Acetona		
		Cf.	Ajuste Lineal		Cf.	Ajuste Lineal		Cf.	Ajuste Lineal		Cf.	Ajuste Lineal	
			Lin.	pte		± t*Sb	Lin.		pte	± t*Sb		Lin.	pte
1	Dicamba	97,0	0,98	0,13	96,1	<u>0,28</u>	<u>0,04</u>	99,2	<u>1,96</u>	<u>0,14</u>	93,8	<u>0,67</u>	<u>0,17</u>
2	2,4-D	98,0	0,99	0,19	95,1	<u>0,23</u>	<u>0,04</u>	95,8	<u>2,33</u>	<u>0,66</u>	94,4	<u>0,63</u>	<u>0,17</u>
3	MCP	99,1	<u>1,11</u>	<u>0,08</u>	97,3	<u>3,26</u>	<u>0,64</u>	99,0	<u>1,35</u>	<u>0,06</u>	94,7	1,00	0,15
4	Diclorprop p	97,6	0,98	0,15	94,6	<u>3,36</u>	<u>0,76</u>	94,2	<u>0,48</u>	<u>0,12</u>	96,7	<u>0,73</u>	<u>0,12</u>
5	MCPA	99,2	1,05	0,16	96,1	<u>3,47</u>	<u>0,49</u>	98,2	1,19	0,25	94,5	1,14	0,17
6	Amidosulfuron	94,1	<u>2,83</u>	<u>1,53</u>	95,5	<u>2,20</u>	<u>1,05</u>	95,5	<u>2,68</u>	<u>1,24</u>	94,9	<u>1,84</u>	<u>0,77</u>
7	Tribenuron metil	94,9	<u>2,06</u>	<u>0,62</u>	95,4	<u>1,96</u>	<u>0,89</u>	94,8	<u>2,38</u>	<u>0,71</u>	96,2	<u>0,69</u>	<u>0,22</u>
8	Fenoxaprop p	95,4	1,01	0,25	96,0	<u>3,77</u>	<u>0,77</u>	94,3	<u>0,47</u>	<u>0,09</u>	98,9	<u>1,15</u>	<u>0,11</u>
9	Diclofop	98,0	<u>0,83</u>	<u>0,05</u>	96,3	<u>0,27</u>	<u>0,04</u>	99,6	<u>2,87</u>	<u>0,12</u>	96,0	<u>0,45</u>	<u>0,06</u>
10	Flamprop	97,0	<u>1,05</u>	<u>0,09</u>	93,6	<u>0,24</u>	<u>0,08</u>	96,5	<u>0,71</u>	<u>0,11</u>	93,9	0,99	0,25
11	Bromoxinil	94,7	<u>1,82</u>	<u>0,49</u>	95,1	<u>3,61</u>	<u>0,45</u>	98,6	<u>1,84</u>	<u>0,30</u>	95,1	<u>0,77</u>	<u>0,07</u>
12	Ioxinil	95,0	<u>0,47</u>	<u>0,09</u>	95,2	<u>0,28</u>	<u>0,05</u>	99,1	<u>1,96</u>	<u>0,12</u>	94,3	<u>0,73</u>	<u>0,17</u>
13	Cianazina	94,1	<u>1,41</u>	<u>0,14</u>	96,0	<u>2,24</u>	<u>0,38</u>	93,9	<u>3,68</u>	<u>0,61</u>	96,8	<u>2,26</u>	<u>0,27</u>
14	Terbutilazina	93,7	1,34	0,70	95,6	1,62	0,74	96,2	1,00	0,12	95,2	1,75	0,79
15	Terbutrina	94,8	0,97	0,19	95,5	<u>0,68</u>	<u>0,08</u>	98,5	<u>0,98</u>	<u>0,02</u>	93,6	<u>0,79</u>	<u>0,18</u>
16	Metribuzina	94,3	<u>0,70</u>	<u>0,21</u>	98,0	<u>1,83</u>	<u>0,28</u>	99,2	<u>1,39</u>	<u>0,11</u>	95,6	<u>0,66</u>	<u>0,15</u>
17	Carfentrazona etil	95,6	<u>0,73</u>	<u>0,14</u>	97,9	<u>0,35</u>	<u>0,04</u>	96,4	<u>2,64</u>	<u>0,98</u>	96,0	<u>4,40</u>	<u>1,98</u>
18	Metoxuron	94,0	<u>1,57</u>	<u>0,25</u>	92,9	2,17	1,27	97,4	<u>3,52</u>	<u>1,32</u>	95,8	1,45	0,49
19	Isoproturon	94,6	<u>2,55</u>	<u>0,51</u>	97,2	<u>0,66</u>	<u>0,23</u>	98,5	<u>3,38</u>	<u>0,39</u>	98,2	<u>4,36</u>	<u>0,93</u>
20	Clortoluron	95,3	<u>4,02</u>	<u>2,05</u>	95,0	0,80	0,28	95,0	<u>2,81</u>	<u>0,32</u>	97,0	<u>1,77</u>	<u>0,44</u>
21	Metabenzotiaz.	95,0	1,28	0,58	96,4	<u>1,73</u>	<u>0,67</u>	97,9	1,13	0,35	95,6	1,46	0,62
22	Linuron	98,6	<u>0,31</u>	<u>0,09</u>	96,9	1,40	0,40	97,1	<u>0,66</u>	<u>0,25</u>	95,2	<u>2,59</u>	<u>0,41</u>
23	Tralkoxidim	97,7	<u>2,16</u>	<u>0,87</u>	94,6	<u>7,84</u>	<u>2,01</u>	94,9	<u>1,31</u>	<u>0,26</u>	97,3	<u>4,91</u>	<u>0,07</u>
24	Flamprop isop.	93,4	0,83	0,18	96,9	<u>1,44</u>	<u>0,20</u>	94,2	1,36	0,52	93,6	<u>0,73</u>	<u>0,12</u>
25	Mefenpir dietil	95,6	0,98	0,14	98,5	<u>1,30</u>	<u>0,13</u>	97,7	<u>1,25</u>	<u>0,24</u>	93,8	<u>0,63</u>	<u>0,23</u>
26	MCPA tioetil	93,8	1,69	0,92	98,0	<u>1,88</u>	<u>0,72</u>	97,0	<u>1,52</u>	<u>0,35</u>	93,7	<u>2,42</u>	<u>1,05</u>
27	Bifenox	96,2	1,09	0,30	94,5	<u>2,92</u>	<u>0,99</u>	94,7	1,15	0,26	97,6	<u>2,16</u>	<u>0,28</u>
28	Fenoxaprop p etil	97,5	<u>0,66</u>	<u>0,03</u>	98,3	<u>1,65</u>	<u>0,20</u>	94,6	<u>0,52</u>	<u>0,09</u>	93,4	<u>0,54</u>	<u>0,13</u>
29	Diclofop metil	94,8	0,88	0,21	98,0	<u>1,47</u>	<u>0,18</u>	95,9	0,87	0,21	96,0	<u>1,63</u>	<u>0,42</u>
30	Prosulfocarb	95,0	1,34	0,58	96,3	1,68	0,69	94,6	<u>1,14</u>	<u>0,13</u>	93,4	1,54	0,71
31	Triallato	95,1	<u>0,69</u>	<u>0,12</u>	94,4	<u>1,99</u>	<u>0,74</u>	98,1	<u>1,47</u>	<u>0,15</u>	94,1	<u>0,60</u>	<u>0,21</u>
32	Diflufenican	95,7	1,00	0,19	98,6	<u>1,45</u>	<u>0,10</u>	98,1	0,97	0,13	94,2	<u>0,74</u>	<u>0,19</u>
33	Pendimetalina	93,8	1,58	0,82	95,4	<u>1,95</u>	<u>0,94</u>	98,2	<u>1,64</u>	<u>0,54</u>	94,5	<u>2,15</u>	<u>1,06</u>
34	Trifluralina	94,2	<u>0,64</u>	<u>0,17</u>	96,4	<u>0,50</u>	<u>0,08</u>	96,3	<u>0,48</u>	<u>0,08</u>	94,9	<u>0,45</u>	<u>0,11</u>
35	MCP isoocílico	93,6	1,33	0,65	94,8	1,65	0,73	99,0	1,09	0,24	95,6	1,60	0,66
36	Bromoxinil oct.	93,5	<u>1,08</u>	<u>0,04</u>	96,1	1,03	0,20	97,8	0,91	0,16	97,8	1,11	0,20
37	Ioxinil octanoato	99,2	1,17	0,27	97,2	0,96	0,33	94,9	<u>1,43</u>	<u>0,18</u>	98,1	0,89	0,14

Se aprecia que el efecto matriz, en general, afectaba a todos los analitos, aunque en menor medida a los obtenidos por *QuEChERS*, incluso aunque no incluyeran limpieza,

como en el caso de los ácidos. Puede deberse a que el acetonitrilo extraía menos material lipofílico de la matriz [5].

En el caso del acetato de etilo, se observaba que a diferencia del método que incluía limpieza con GPC, prácticamente todos los analitos estaban afectados por el efecto matriz. Este disolvente era el más efectivo en impedir la extracción de azúcares, pero también extraía más interferencias polares de la matriz, sobre todo comparado con la acetona, que en esta adaptación no se eliminaban al no contar con GPC [17].

El reparto de la acetona con el diclorometano y el éter de petróleo se ha descrito como el más selectivo para disminuir los co-extractos polares [13], lo que justifica que muchos menos herbicidas se veían afectados por el efecto matriz comparado con la extracción en acetona sin reparto, que extraía muchas interferencias polares desde la matriz.

4.3.2.2. Diferencias entre la Extracción de Residuos de Herbicidas en Muestras de Grano y Paja

El grano de cebada contiene más proteínas (10-11%) y grasas (2,1%) que la paja, cuya composición es prácticamente fibra [1], por lo que se esperaba las recuperaciones fueran menores en las muestras de grano respecto de las de paja, al haber más componentes que podían interferir desde la matriz.

Se observó (Figura 4.10) que las recuperaciones (Tabla 4.7 para la paja) eran similares en el caso del grano y la paja para todos los métodos. Se apreciaba que eran ligeramente superiores para las muestras de paja frente al grano en el caso de *QuEChERS*, observándose el efecto contrario para el mini Luke.

Para los analitos neutros y básicos, el acetato de etilo parecía ser el que proporcionaba recuperaciones más parecidas, y, por tanto, más robustas, al igual que con el mini Luke acidificado para los herbicidas ácidos.

La linealidad de los procedimientos analíticos se estudió con 5 repeticiones de calibrados preparados en extractos blancos de muestras de paja extraídos con los diferentes métodos. Se comprobó que los calibrados eran más lineales en el caso de las muestras de paja (Tabla 4.8), aunque a simple vista sus cromatogramas parecían más sucios que los de grano (Figuras 4.12 y 4.13).

En general, no existían diferencias apreciables en el efecto matriz entre las muestras de grano y paja, por lo que parecía que el efecto matriz dependía más del método que se estaba utilizando que del tipo de muestra.

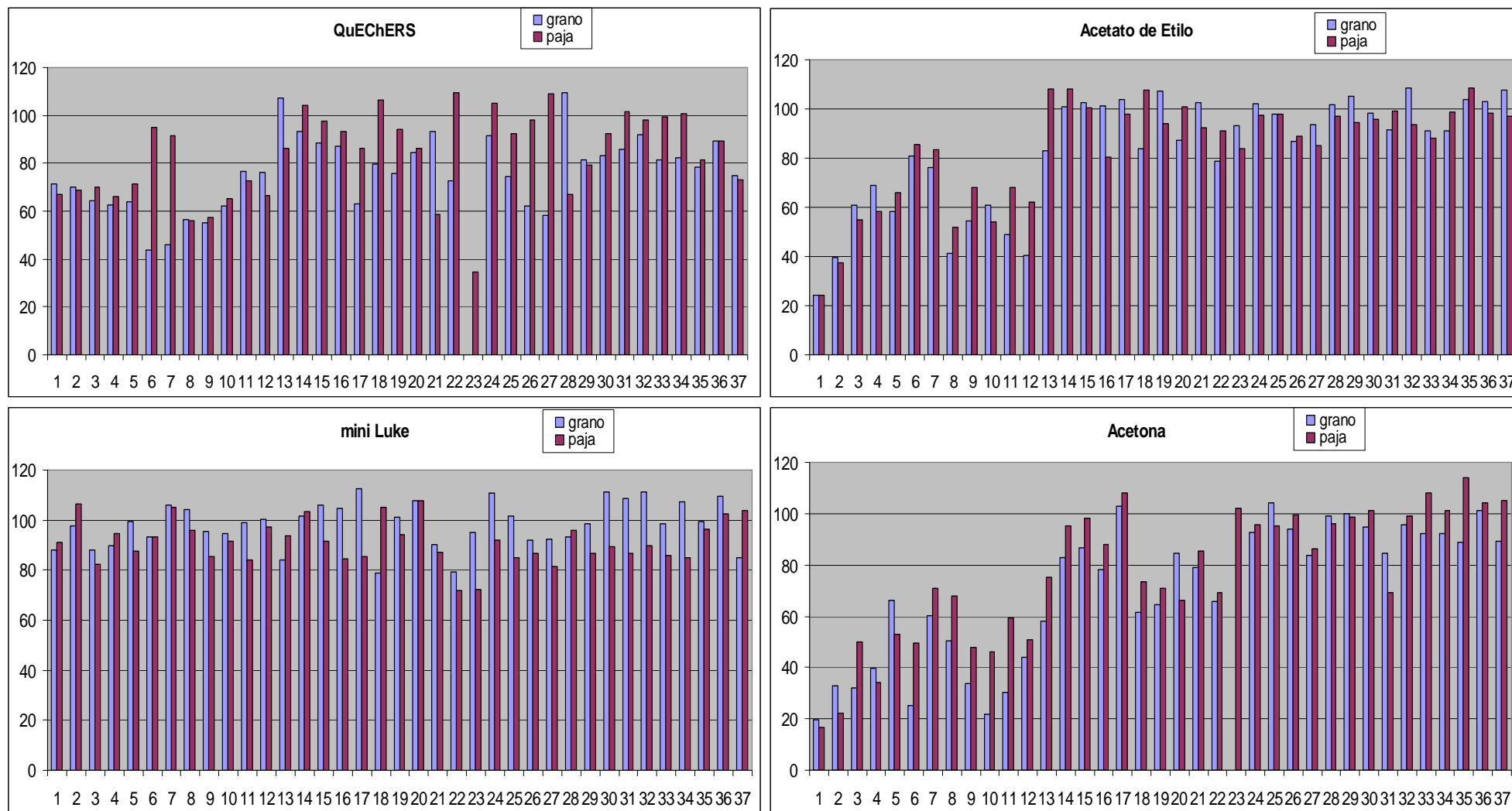


Figura 4.10. Comparación de las recuperaciones obtenidas con los 4 métodos en muestras de **Grano y Paja** contaminadas a $250 \mu\text{g kg}^{-1}$. Los herbicidas se han numerado como en las tablas.

Tabla 4.7. Recuperaciones y coeficientes de variación para muestras blancas de **Paja** contaminadas con 250 µg kg⁻¹ y extraídas con los 4 procedimientos en el **ITACyL**. Se han subrayado los datos que no cumplen los criterios.

Nº	Herbicida	Q 250ppb	%CV (n=5)	AcE 250ppb	%CV (n=5)	mL 250ppb	%CV (n=5)	Ac 250ppb	%CV (n=5)
1	Dicamba	<u>67,0b</u>	10,8	<u>24,3c</u>	3,1	91,1a	12,2	<u>16,8c</u>	4,0
2	2,4-D	<u>68,6b</u>	7,9	<u>37,3c</u>	2,3	106,4a	4,8	<u>22,1c</u>	9,2
3	MCP	70,2b	11,0	<u>54,7c</u>	3,5	82,4a	1,3	<u>49,9c</u>	9,0
4	Diclorprop p	<u>66,0b</u>	0,1	<u>58,3b</u>	5,4	94,8a	11,4	<u>34,2c</u>	2,4
5	MCPA	71,2b	6,3	<u>66,0b</u>	3,4	87,5a	4,3	<u>53,0c</u>	12,7
6	Amidosulfuron	95,2a	9,3	85,5b	9,9	93,3a	13,0	<u>49,4c</u>	8,2
7	Tribenuron metil	91,7a	9,1	83,3ab	6,7	105,1a	<u>15,3</u>	71,0b	16,3
8	Fenoxaprop p	<u>56,3bc</u>	8,0	<u>52,1c</u>	4,6	95,7a	12,2	<u>68,1bc</u>	7,5
9	Diclofop	<u>57,3c</u>	8,6	<u>68,1b</u>	2,2	85,2a	9,7	<u>47,7c</u>	12,7
10	Flamprop	<u>65,3b</u>	6,1	<u>54,0bc</u>	5,1	91,4a	6,3	<u>45,9c</u>	5,3
11	Bromoxinil	72,8ab	9,3	<u>68,2b</u>	4,1	84,1a	3,6	<u>59,3b</u>	1,3
12	Ioxinil	<u>66,6b</u>	11,8	<u>62,2bc</u>	9,8	97,3a	8,7	<u>50,7c</u>	3,7
13	Cianazina	83,2b	6,4	108,0a	13,1	93,7a	14,3	75,1b	11,8
14	Terbutilazina	92,7b	11,9	107,9a	1,3	103,6a	<u>14,7</u>	95,4ab	5,9
15	Terbutrina	83,8c	8,5	100,3a	2,0	91,6b	7,5	98,1a	4,4
16	Metribuzina	104,6a	11,3	80,5b	9,3	84,3b	4,9	88,0b	7,2
17	Carfentrazona etil	87,6c	6,2	98,0b	4,7	85,3c	5,6	107,9ab	2,2
18	Metoxuron	94,6b	6,4	107,5a	6,7	105,0a	<u>16,8</u>	73,4c	10,1
19	Isoproturon	102,1a	10,9	94,1b	8,1	94,1b	12,8	70,7c	13,0
20	Clortoluron	82,1b	10,7	100,9a	4,5	107,7a	10,5	<u>66,3c</u>	11,4
21	Metabenzotiazuron	70,4c	5,8	92,5a	14,7	87,3b	4,0	85,5b	1,5
22	Linuron	106,6a	13,7	90,9b	4,9	71,9c	8,3	<u>69,1c</u>	5,8
23	Tralkoxidim	11,3c	8,2	83,6b	8,0	72,1b	8,3	102,1a	<u>15,2</u>
24	Flamprop isopropil	86,9b	10,4	97,5a	2,7	91,9a	5,5	95,9a	9,2
25	Mefenpir dietil	85,3b	8,6	98,0a	4,2	85,0b	6,2	95,3a	9,9
26	MCPA tioetil	<u>69,9c</u>	9,9	88,9b	2,5	86,7b	8,3	99,3a	4,5
27	Bifenox	89,2a	9,3	85,0a	1,6	81,3a	<u>17,8</u>	86,5a	8,6
28	Fenoxaprop p etil	76,4b	9,5	97,1a	8,8	95,7a	3,8	96,1a	14,2
29	Diclofop metil	74,5c	12,3	94,3ab	3,4	86,5b	6,8	98,5a	10,7
30	Prosulfocarb	96,1a	7,6	95,7a	5,0	89,5b	3,8	101,1a	7,8
31	Triallato	79,2b	11,7	99,3a	6,8	86,8b	7,7	<u>69,0c</u>	12,0
32	Diflufenican	87,3b	10,3	93,5a	3,2	89,7ab	4,8	98,9a	10,2
33	Pendimetalina	85,4b	6,8	87,9b	5,2	86,0b	7,7	108,1a	6,3
34	Trifluralina	89,0b	8,1	98,7a	5,4	85,1b	12,2	101,4a	4,8
35	MCP isoocílico	<u>62,1c</u>	8,0	108,3a	5,8	96,4b	9,4	114,2a	6,0
36	Bromoxinil oct.	<u>47,3c</u>	13,3	98,4b	13,0	102,5a	15,0	104,4a	10,1
37	Ioxinil octanoato	75,5b	6,2	97,2a	10,7	103,7a	<u>15,1</u>	104,9a	11,6
	Criterios	70-110	< 15	70-110	< 15	70-110	< 15	70-110	< 15

Tabla 4.8. Coeficientes de linealidad y presencia del efecto matriz (datos subrayados) para los calibrados en matriz preparados sobre extractos blancos de muestras de **Paja** extraídos con los 4 métodos en el **ITACyL**.

Nº	Herbicida	QuEChERS			Acetato de Etilo			Mini Luke			Acetona		
		Cf. Lin.	Ajuste Lineal pte	± t*Sb	Cf. Lin.	Ajuste Lineal pte	± t*Sb	Cf. Lin.	Ajuste Lineal pte	± t*Sb	Cf. Lin.	Ajuste Lineal pte	± t*Sb
1	Dicamba	99,2	<u>1,23</u>	<u>0,07</u>	98,2	<u>3,14</u>	<u>0,30</u>	96,2	<u>0,68</u>	<u>0,10</u>	99,3	<u>1,38</u>	<u>0,09</u>
2	2,4-D	93,9	<u>1,46</u>	<u>0,34</u>	97,1	<u>2,85</u>	<u>0,51</u>	96,7	<u>1,43</u>	<u>0,16</u>	98,9	<u>0,78</u>	<u>0,13</u>
3	MCPP	98,4	<u>0,90</u>	<u>0,02</u>	98,5	<u>3,60</u>	<u>0,10</u>	97,8	<u>1,57</u>	<u>0,09</u>	96,9	<u>1,63</u>	<u>0,11</u>
4	Diclorprop p	95,0	<u>1,40</u>	<u>0,31</u>	93,8	<u>0,30</u>	<u>0,08</u>	93,6	<u>0,58</u>	<u>0,15</u>	96,3	<u>1,36</u>	<u>0,29</u>
5	MCPA	94,7	<u>2,41</u>	<u>0,81</u>	95,5	<u>2,94</u>	<u>0,95</u>	96,1	<u>1,25</u>	<u>0,06</u>	99,2	<u>0,42</u>	<u>0,05</u>
6	Amidosulfuron	94,1	<u>3,00</u>	<u>1,62</u>	98,2	<u>3,71</u>	<u>1,36</u>	96,6	<u>3,15</u>	<u>1,37</u>	98,7	<u>0,39</u>	<u>0,09</u>
7	Tribenuron m.	95,3	<u>2,22</u>	<u>0,60</u>	93,3	<u>2,12</u>	<u>1,09</u>	95,1	<u>2,08</u>	<u>0,64</u>	99,2	<u>2,47</u>	<u>0,33</u>
8	Fenoxaprop p	94,6	<u>3,68</u>	<u>1,88</u>	99,1	<u>2,58</u>	<u>0,20</u>	93,5	<u>1,05</u>	<u>0,35</u>	96,3	<u>1,51</u>	<u>0,21</u>
9	Diclofop	97,6	1,00	0,07	97,8	<u>2,95</u>	<u>0,17</u>	96,6	<u>0,57</u>	<u>0,06</u>	99,0	<u>1,12</u>	<u>0,06</u>
10	Flamprop	94,1	1,24	0,28	95,7	<u>0,34</u>	<u>0,07</u>	95,3	<u>0,50</u>	<u>0,10</u>	97,2	<u>1,54</u>	<u>0,25</u>
11	Bromoxinil	95,7	1,04	0,33	94,2	<u>2,23</u>	<u>0,91</u>	98,8	<u>1,48</u>	<u>0,26</u>	99,1	<u>0,52</u>	<u>0,08</u>
12	Ioxinil	97,0	<u>0,82</u>	<u>0,12</u>	96,8	<u>4,66</u>	<u>0,72</u>	95,5	<u>0,66</u>	<u>0,15</u>	98,4	<u>1,80</u>	<u>0,18</u>
13	Cianazina	92,9	0,93	0,19	97,3	<u>1,58</u>	<u>0,34</u>	94,7	<u>0,47</u>	<u>0,09</u>	97,0	<u>1,36</u>	<u>0,07</u>
14	Terbutilazina	98,0	<u>1,01</u>	<u>0,34</u>	95,1	1,12	0,53	99,1	<u>1,07</u>	<u>0,26</u>	99,4	1,03	0,28
15	Terbutrina	96,1	1,08	0,10	98,1	1,01	0,08	98,4	0,97	0,13	99,0	<u>0,86</u>	<u>0,03</u>
16	Metribuzina	96,6	<u>0,65</u>	<u>0,14</u>	98,7	<u>1,35</u>	<u>0,11</u>	94,6	<u>0,72</u>	<u>0,17</u>	99,3	<u>1,23</u>	<u>0,10</u>
17	Carfentraz. e.	96,2	<u>0,78</u>	<u>0,11</u>	97,0	<u>0,38</u>	<u>0,05</u>	94,2	<u>0,48</u>	<u>0,13</u>	96,4	<u>0,84</u>	<u>0,13</u>
18	Metoxuron	97,1	1,24	0,27	98,0	<u>0,56</u>	<u>0,21</u>	94,8	<u>2,77</u>	<u>1,06</u>	98,7	<u>0,38</u>	<u>0,13</u>
19	Isoproturon	93,9	<u>1,36</u>	<u>0,08</u>	98,5	<u>3,03</u>	<u>0,54</u>	96,9	<u>2,17</u>	<u>0,03</u>	98,5	<u>2,13</u>	<u>0,44</u>
20	Clortoluron	95,8	<u>3,64</u>	<u>1,28</u>	94,8	0,76	0,24	97,7	<u>0,75</u>	<u>0,13</u>	98,4	1,00	0,21
21	Metabenzotiaz.	96,8	0,84	0,24	93,6	0,92	0,41	93,5	1,02	0,53	97,7	0,97	0,33
22	Linuron	93,8	<u>2,32</u>	<u>1,06</u>	93,3	<u>2,85</u>	<u>0,36</u>	94,7	<u>4,95</u>	<u>2,22</u>	96,7	<u>1,00</u>	<u>0,22</u>
23	Tralkoxidim	93,1	<u>4,18</u>	<u>2,52</u>	93,6	1,34	0,42	94,5	<u>0,70</u>	<u>0,20</u>	98,6	0,98	0,13
24	Flamprop isop.	95,9	1,01	0,17	94,6	<u>0,78</u>	<u>0,18</u>	98,5	1,08	0,13	99,1	0,90	0,12
25	Mefenpir dietil	96,0	<u>1,14</u>	<u>0,11</u>	93,3	0,89	0,18	96,0	0,96	0,23	96,8	<u>1,11</u>	<u>0,06</u>
26	MCPA tioetil	97,3	1,10	0,45	98,8	1,23	0,41	95,1	<u>1,30</u>	<u>0,26</u>	94,3	1,20	0,66
27	Bifenox	94,9	1,23	0,38	97,2	<u>3,23</u>	<u>0,64</u>	94,9	<u>0,53</u>	<u>0,18</u>	98,0	<u>1,30</u>	<u>0,20</u>
28	Fenoxaprop p e.	95,5	1,02	0,13	98,4	<u>1,10</u>	<u>0,01</u>	97,7	<u>0,81</u>	<u>0,08</u>	98,4	<u>1,02</u>	<u>0,03</u>
29	Diclofop metil	95,2	0,98	0,18	93,8	<u>0,79</u>	<u>0,20</u>	98,1	1,14	0,19	98,3	0,88	0,14
30	Prosulfocarb	96,7	1,09	0,39	97,6	0,90	0,14	94,7	1,18	0,40	95,0	1,03	0,49
31	Trialato	93,2	0,88	0,37	97,9	<u>1,27</u>	<u>0,25</u>	97,8	<u>1,21</u>	<u>0,08</u>	97,2	0,96	0,07
32	Diflufenican	95,8	1,08	0,18	93,7	0,83	0,22	98,0	0,91	0,12	98,1	1,06	0,08
33	Pendimetalina	99,1	1,06	0,33	98,1	<u>1,37</u>	<u>0,29</u>	96,5	<u>1,49</u>	<u>0,22</u>	98,4	1,38	0,44
34	Trifluralina	96,5	<u>0,89</u>	<u>0,14</u>	97,9	<u>0,79</u>	<u>0,09</u>	95,4	<u>0,79</u>	<u>0,16</u>	98,7	<u>0,87</u>	<u>0,03</u>
35	MCPP isooc.	94,2	0,90	0,42	95,3	<u>1,40</u>	<u>0,49</u>	96,2	1,12	0,42	97,6	0,88	0,13
36	Bromoxinil oct.	93,6	<u>1,24</u>	<u>0,27</u>	95,8	<u>4,93</u>	<u>0,39</u>	94,4	<u>3,31</u>	<u>0,48</u>	95,0	<u>3,53</u>	<u>1,13</u>
37	Ioxinil oct.	95,0	<u>1,58</u>	<u>0,38</u>	96,8	<u>1,57</u>	<u>0,58</u>	95,5	<u>0,89</u>	<u>0,32</u>	97,1	<u>2,60</u>	<u>0,88</u>

4.3.2.3. QuEChERS-Buffered QuEChERS

Se ensayó la modificación propuesta para el *QuEChERS*, para muestras de grano y paja, para estudiar si la introducción de un tampón en las extracciones mejoraba la recuperación de los analitos [39].

El efecto del tampón en el extracto no proporcionaba mejores resultados (Figura 4.11), incluso se obtenían peores recuperaciones para la mayoría de los analitos que con el método *QuEChERS* original, sobre todo para los ácidos en las muestras de grano. En el

caso de las muestras de paja, las recuperaciones fueron algo mayores respecto de las extracciones en grano, de manera más acusada para los herbicidas de polaridad media y los apolares que para los ácidos.

Al concentrar los extractos obtenidos con estos métodos se apreciaban precipitados blancos que provocaban muchas interferencias en GC. Se cree que provenían de las sales utilizadas para la separación de fases, aunque los creadores del método afirmasen que eran insolubles en el acetonitrilo.

También se evaluó la limpieza proporcionada por el PSA para todos los analitos en el método original y su modificación. Se comprobó que retenía sobre todo los ácidos aunque también en cierta medida los de polaridad media y apolares, como ya se vió en el Capítulo 3 para las muestras de suelo.

La linealidad de los procedimientos analíticos se estudió con 5 repeticiones de calibrados de (10-500 µg/l) a 6 niveles, preparados en extractos blancos de grano y paja extraídos con el método *QuEChERS* original y su modificación, *Buffered QuEChERS*.

El PSA eliminaba ligeramente el color amarillo de los extractos de las muestras de *QuEChERS*, pero el efecto no se apreciaba demasiado en los cromatogramas. Paradójicamente los analitos presentaban peores coeficientes de linealidad en el método que incluía la limpieza por PSA, lo que podía explicarse porque este adsorbente eliminaba componentes de la matriz que proporcionaban una protección adecuada a los analitos en el sistema de inyección y la columna mejorando su introducción al sistema cromatográfico [48].

Conclusión

El método *QuEChERS* proporcionaba recuperaciones medias aceptables para todos los analitos pero no lo suficientemente buenas, ya que era necesario concentrar el extracto antes de su análisis, lo cual conllevaba pérdidas.

Los herbicidas ácidos únicamente se recuperaron de manera aceptable con el método mini Luke con ajuste de pH antes del reparto, y, por tanto, fue el método escogido para éstos.

Se escogió el método del acetato de etilo para los herbicidas básicos y neutros ya que era el que proporcionaba las mejores recuperaciones. También eran satisfactorias las proporcionadas por el mini Luke pero necesitaba de un reparto para eliminar el agua, mientras que en el acetato de etilo se producía en una única etapa gracias a que era prácticamente inmiscible con el agua.

Aunque no incluía la limpieza por GPC, se demostró que los analitos estaban afectados por el efecto matriz en la misma medida que otros métodos en los que se limpiaba el extracto. Por eso siempre se utilizaron calibrados en matriz, para identificar y cuantificar correctamente los herbicidas.

Los dos métodos escogidos, el del Acetato de Etilo y el mini Luke acidificado (ambos detallados en la Tabla 4.1) fueron los que proporcionaron las recuperaciones más similares para las muestras de grano y de paja, y, por tanto, más robustas, para todos los analitos.

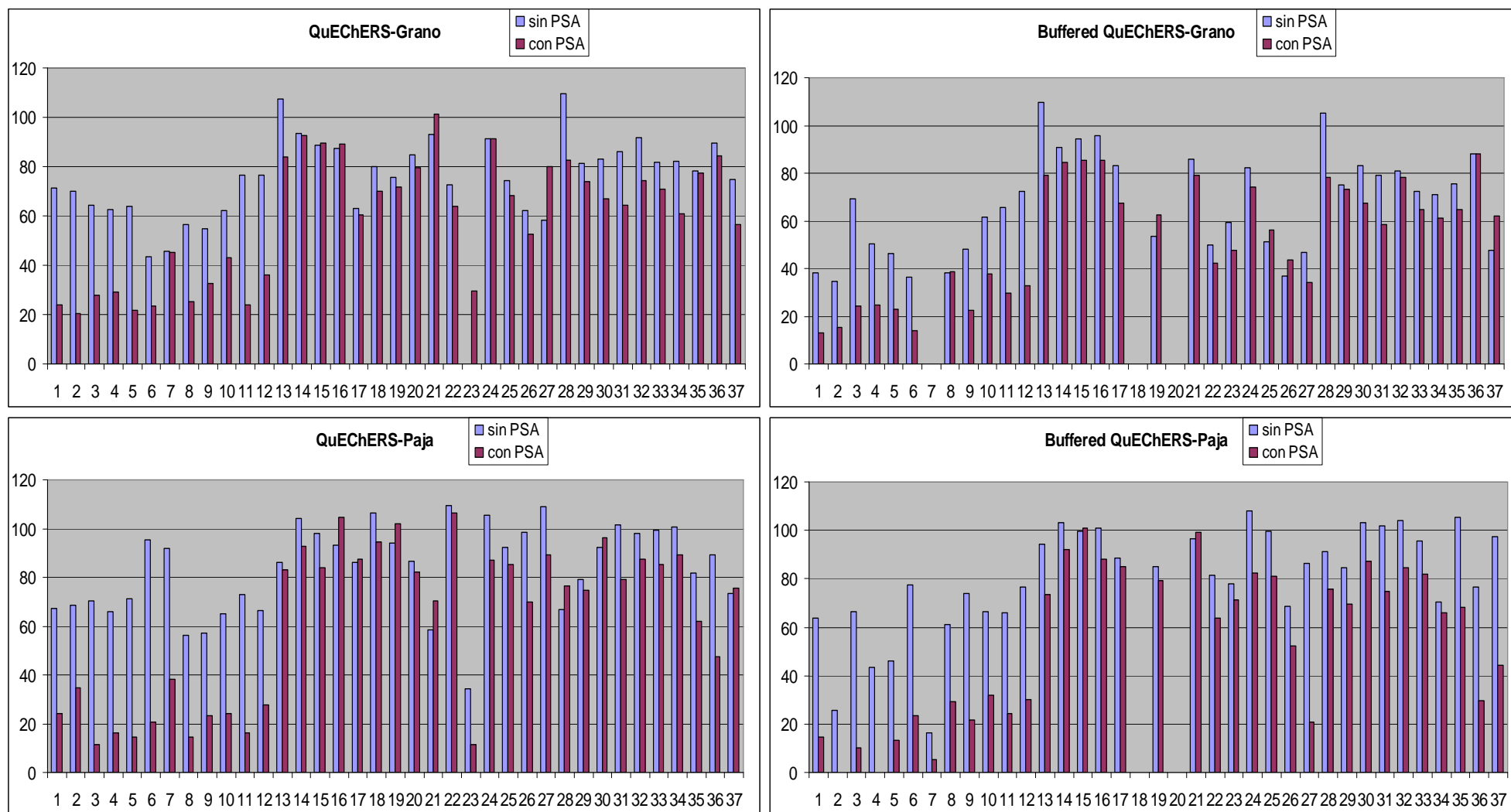


Figura 4.11. Comparación de las recuperaciones obtenidas con el método *QuEChERS* y *Buffered QuEChERS* con y sin limpieza con PSA, en muestras de **Grano** y **Paja** contaminadas a $250 \mu\text{g kg}^{-1}$. Los herbicidas se han numerado como en las tablas.

4.3.3. VALIDACIÓN

Las pruebas de robustez se han considerado las de Grano y Paja y la evaluación del efecto matriz se ha realizado también a lo largo de la comparación de los métodos. Se han comparado todos los resultados de la validación con los criterios europeos [44].

4.3.3.1. Especificidad/Selectividad

Cada tanda de experimentos se llevó a cabo con un blanco de reactivos para demostrar que todos los equipos y reactivos no introducían interferencias bajo las condiciones de análisis, y una muestra blanca de grano o de paja para estudiar si la presencia de interferencias podía conducir a una falsa identificación, la identificación de los analitos se veía dificultada o la cuantificación sufría una influencia apreciable.

El uso de un detector MS aseguraba una gran selectividad y especificidad. Se realizó un estudio de solapamiento entre iones de herbicidas adyacentes, comprobándose que no coincidían los iones característicos de aquellos picos solapados o cercanos, y que no sufrían interferencias por parte de la matriz. Se observa que las interferencias son mayores en el caso de los extractos de paja respecto del grano (Figuras 4.12 y 4.13), y ambas respecto de los extractos de suelo (Figuras 3.22 y 3.23).

4.3.3.2. Linealidad

La linealidad de los procedimientos analíticos escogidos se estudió con el promedio de 5 repeticiones de calibrados preparados en extractos blancos de grano o paja extraídos con el método mini Luke con ajuste de pH para los herbicidas ácidos, y con el método del acetato de etilo para los neutros y básicos. Los resultados se presentan conjuntamente para las muestras de grano y paja en la Tabla 4.9.

Para estudiar la linealidad de los calibrados, se utilizaron los parámetros descritos en los Capítulos 2 y 3. Se obtuvieron, en general, calibraciones lineales para todos los compuestos analizados con GC-MS en todo el rango experimentado (0,01-0,5 mg/l), aunque algunos compuestos presentaron valores inferiores al 95%, sobre todo los analitos de polaridad media en las muestras de paja, ya que estaban más afectadas por las interferencias.

4.3.3.3. Límites de Detección y Cuantificación

Ambos límites se calcularon de la manera en que ya se había detallado en el Capítulo 3. Los resultados se presentan en la Tabla 4.9. Se contaminaron muestras blanco de grano y paja con el LC y se comprobó que realmente cumplían los criterios exigidos (Figuras 4.12 y 4.13).

Debido a que se escogió el método mini Luke con ajuste de pH para los herbicidas ácidos, y el método del acetato de etilo para los neutros y básicos, los extractos finales de grano contenían 2,5 g de matriz, y los de paja, 1,25 g de matriz. Por lo tanto, estos fueron los valores que se utilizaron como factor de dilución de las muestras para el cálculo de los límites analíticos.

Según la Directiva 91/414/CEE, para el análisis de residuos en plantas tratadas, la sensibilidad que proporcionen los métodos debe satisfacer los criterios en límites de determinación respecto de los LMRs comunitarios, de tal manera que si el LMR es menor o igual de 0,05 mg/kg, su límite de determinación debe ser la mitad. Los LMR se han tomado de la misma manera para grano y paja, ya que la normativa sólo habla de cebada (Tablas 4.9) [49]. Se observa que algunos LC superaron los límites de determinación recomendados, sobre todo para las muestras de paja.

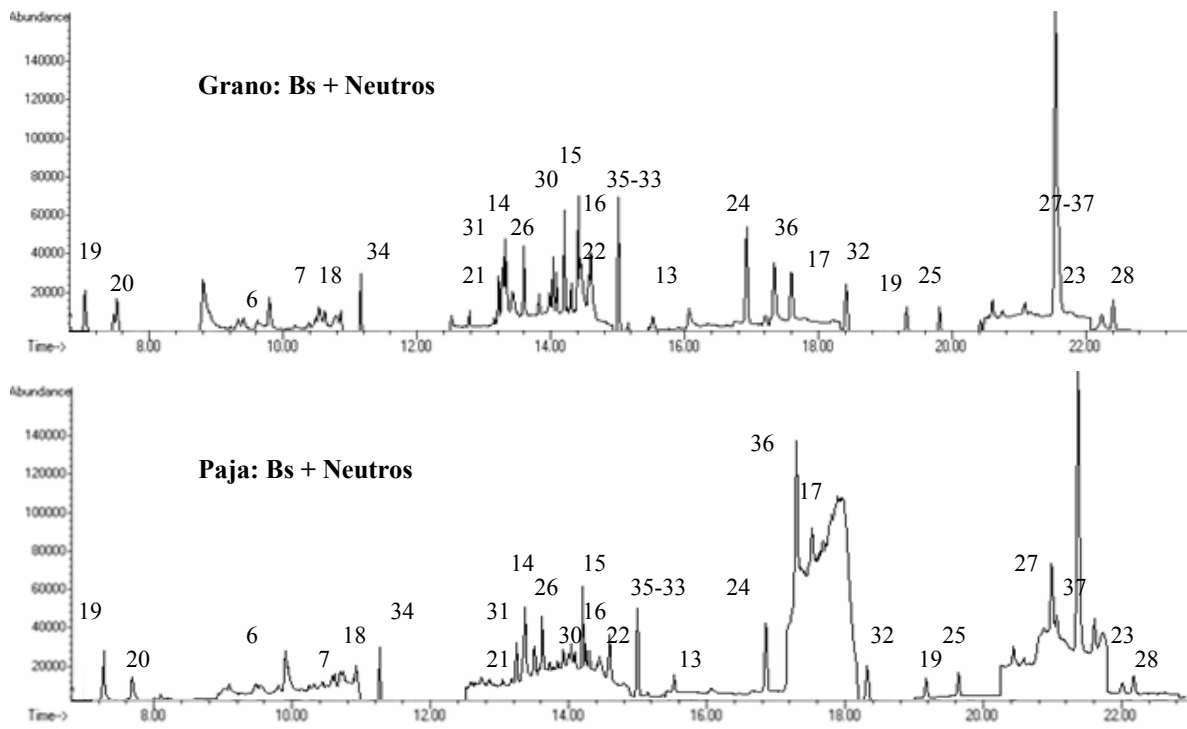


Figura 4.12. Cromatograma de un blanco de grano y paja contaminado con los herbicidas Básicos y Neutros a nivel del LC, extraído con el método del Acetato de etilo y analizados por GC-MS. Los picos se han numerado como en la Tabla 4.9.

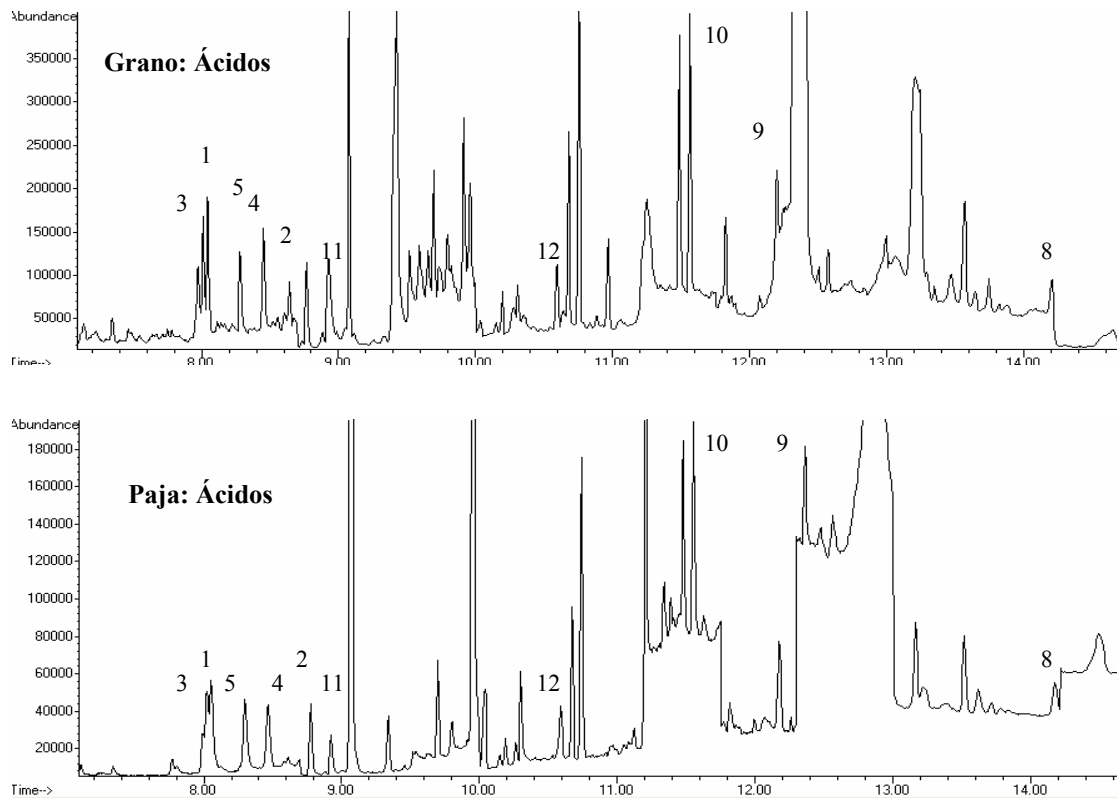


Figura 4.13. Cromatograma de un blanco de grano y paja contaminado con los herbicidas Ácidos a nivel del LC, extraído con el método del mini Luke acidificado y analizados por GC-MS. Los picos se han numerado como en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Parámetros de linealidad de los calibrados preparados en extractos blancos de Grano y Paja con los dos métodos escogidos. Límites de detección (LD), cuantificación (LC), de determinación permitido (LCmax) y máximo de residuos (LMR). Se han subrayado los datos que no cumplen los criterios.

Nº Herbicida	GRANO							PAJA						
	P a posteriori	Coef. Lin.	% CVfr	LD (ug/kg)	LC (ug/kg)	LC max	LMR (ug/kg)	P a posteriori	Coef. Lin.	% CVfr	LD (ug/kg)	LC (ug/kg)	LC max	LMR
1 Dicamba	0,05	99,2	5,0	2,84	9,46	25	50	0,05	96,2	2,6	3,25	10,82	25	50
2 2,4-D	0,27	95,8	9,9	4,55	15,18	25	50	0,13	96,7	6,7	8,51	<u>28,38</u>	25	50
3 MCPP	0,21	99,0	7,8	6,20	20,67	25	50	0,05	97,8	0,5	3,77	12,55	25	50
4 Diclorprop p	0,05	<u>94,2</u>	13,8	15,35	<u>51,18</u>	25	50	0,13	<u>93,6</u>	7,4	10,23	<u>34,11</u>	25	50
5 MCPA	0,15	98,2	5,1	3,52	11,73	50	100	0,09	96,1	6,0	3,15	10,51	50	100
6 Amidosulfuron	0,15	95,5	9,0	5,58	18,62	25	50	0,10	96,6	8,1	18,83	<u>62,76</u>	25	50
7 Tribenuron metil	0,40	<u>94,8</u>	6,9	3,27	10,91	25	50	0,34	95,1	8,8	15,81	<u>52,70</u>	25	50
8 Fenoxaprop p	0,05	<u>94,3</u>	11,2	3,98	13,26	10	20	0,08	<u>93,5</u>	11,7	4,50	<u>14,99</u>	10	20
9 Diclofop	0,08	99,6	9,2	3,99	13,30	25	50	0,05	96,6	0,8	1,83	6,12	25	50
10 Flamprop	0,06	96,5	8,2	11,84	<u>39,45</u>	25	50	0,05	95,3	6,7	12,49	<u>41,63</u>	25	50
11 Bromoxinil	0,07	98,6	3,5	3,72	12,40	25	50	0,05	98,8	4,6	5,74	19,15	25	50
12 Ioxinil	0,06	99,1	9,3	6,68	22,27	25	50	0,07	95,5	4,1	3,61	12,04	25	50
13 Cianazina	0,43	96,0	13,2	6,73	22,44	25	50	0,24	97,3	12,0	13,45	<u>44,83</u>	25	50
14 Terbutilazina	0,05	95,6	13,3	2,64	8,78	25	50	0,15	95,1	12,7	15,96	<u>53,20</u>	25	50
15 Terbutrina	0,40	95,5	4,7	4,33	14,42	25	50	0,32	98,1	6,3	6,13	20,43	25	50
16 Metribuzina	0,13	98,0	8,1	3,13	10,42	50	100	0,05	98,7	4,5	3,39	11,30	50	100
17 Carfentrazona etil	0,05	97,9	14,4	12,75	<u>42,51</u>	25	50	0,36	97,0	7,0	8,95	<u>29,83</u>	25	50
18 Metoxuron	0,06	<u>92,9</u>	12,4	5,42	18,06	25	50	0,05	98,0	11,3	11,02	<u>36,75</u>	25	50
19 Isoproturon	0,05	97,2	9,4	6,31	21,04	25	50	0,05	98,5	11,3	6,18	20,60	25	50
20 Clortoluron	0,35	95,0	10,5	6,63	22,10	25	50	0,06	<u>94,8</u>	10,0	12,56	<u>41,87</u>	25	50
21 Metabenzotiazuron	0,35	96,4	8,4	9,72	<u>32,41</u>	25	50	0,05	<u>93,6</u>	7,1	8,98	<u>29,92</u>	25	50
22 Linuron	0,05	96,9	11,1	13,66	<u>45,54</u>	25	50	0,26	<u>93,3</u>	7,1	11,49	<u>38,29</u>	25	50
23 Tralkoxidim	0,16	<u>94,6</u>	6,6	5,69	18,96	25	50	0,05	<u>93,6</u>	11,7	11,29	<u>37,64</u>	25	50
24 Flamprop isopropil	0,08	96,9	9,0	3,70	12,34	25	50	0,08	<u>94,6</u>	8,8	13,21	<u>44,05</u>	25	50
25 Mefenpir dietil	0,16	98,5	14,7	10,29	34,31	50	200	0,28	<u>93,3</u>	2,3	6,34	21,15	50	200
26 MCPA tioetil	0,10	98,0	12,7	5,16	17,19	25	50	0,05	98,8	5,4	8,46	<u>28,19</u>	25	50
27 Bifenox	0,49	<u>94,5</u>	10,6	8,42	<u>28,07</u>	25	50	0,05	97,2	10,6	9,90	<u>33,01</u>	25	50
28 Fenoxaprop p etil	0,34	98,3	5,6	6,68	<u>22,28</u>	10	20	0,10	98,4	14,3	7,00	<u>23,34</u>	10	20
29 Diclofop metil	0,18	98,0	6,7	7,04	23,46	25	50	0,26	<u>93,8</u>	7,2	8,22	<u>27,41</u>	25	50
30 Prosulfocarb	0,26	96,3	9,1	10,20	<u>33,99</u>	10	20	0,47	97,6	14,8	15,42	<u>51,41</u>	10	20
31 Trialato	0,15	<u>94,4</u>	14,1	8,63	28,78	50	100	0,05	97,9	5,5	7,97	26,58	50	100
32 Diflufenican	0,27	98,6	8,8	8,14	<u>27,13</u>	10	20	0,29	<u>93,7</u>	3,2	5,75	<u>19,17</u>	10	20
33 Pendimetalina	0,08	95,4	5,7	6,90	23,01	25	50	0,06	98,1	14,3	7,43	24,76	25	50
34 Trifluralina	0,08	96,4	6,4	5,32	17,74	25	50	0,06	97,9	4,2	12,49	<u>41,65</u>	25	50
35 MCPP isoocílico	0,19	<u>94,8</u>	12,6	9,89	<u>32,97</u>	25	50	0,06	95,3	3,7	4,06	13,52	25	50
36 Bromoxinil octanoato	0,05	96,1	10,2	4,91	16,35	25	50	0,05	95,8	5,3	9,09	<u>30,30</u>	25	50
37 Ioxinil octanoato	0,44	97,2	7,4	12,15	<u>40,50</u>	25	50	0,19	96,8	14,2	8,19	<u>27,29</u>	25	50
Criterios	>0,05	>95	<15		<LCmax			>0,05	>95	<15		<LCmax		

4.3.3.4. Exactitud (Recuperación) y Precisión

Recuperación

Los estudios de recuperación se realizaron a 3 concentraciones diferentes, con el objetivo de cubrir las concentraciones de herbicidas presentes en las muestras reales de grano y paja: 50, 150 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, es decir, a 1, 3 y 5 veces el LMR mayoritario en cebada, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [49].

No se encontraron materiales de referencia certificados en cebada, por tanto, las muestras usadas para los estudios de recuperación se prepararon en el laboratorio a partir de muestras blanco de grano y paja que se contaminaban con concentraciones conocidas de los herbicidas, con el método ya descrito que permitía simular muestras con residuos envejecidos, análogamente a las muestras de suelos.

Las medias de las recuperaciones de 5 repeticiones obtenidas en dos días diferentes se muestran en la Tabla 4.10. Las recuperaciones de los herbicidas a todos los niveles estuvieron en el rango de 70-120%, para los criterios de SANCO/10476/2003 y 70-110% para el SANCO/10232/2006 [44]. Las diferencias debidas a las concentraciones de los analitos entre los distintos niveles fueron mínimas respecto de la recuperación y se obtuvieron valores adecuados de precisión, es decir, $\text{CV} < 20\%$, para los dos niveles más bajos de concentración, y $\text{CV} < 15\%$ para los niveles más concentrados [44]. El nivel más bajo es el que presentó peor precisión en ambos tipos de muestras debido a que las interferencias de la matriz le afectaban más.

La linealidad de la extracción se comprobó calculando los coeficientes de linealidad en el rango extraído (50-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) estudiado a 3 niveles. Todos los analitos tuvieron buena linealidad en la extracción, a excepción de algunos apolares en las muestras de grano y paja, para los que el coeficiente de linealidad era ligeramente inferior al 95%.

No se realizaron pruebas de segundas extracciones sobre el residuo de grano y paja ya extraído, ya que los métodos utilizados, establecidos desde hace mucho tiempo, no las especifican. En el caso del *QuEChERS* y *Buffered QuEChERS* no había posibilidad de extraer de nuevo el residuo de grano y paja puesto que quedaba mezclado con las sales.

Con los datos obtenidos en las pruebas de recuperación, se representó la concentración obtenida frente a la añadida para comprobar si el uso del calibrado en matriz para cuantificar era adecuado o no. Al hacer la regresión por el método de mínimos cuadrados se obtuvo una línea recta cuya ordenada en el origen incluía el valor de cero y cuya pendiente incluía el valor de uno (únicos valores que se han representado en la Tabla 4.10), es decir no existía un error sistemático debido a la matriz, lo que demostraba que el uso del calibrado en matriz era adecuado y no hacía falta usar el método de adiciones patrón para cuantificar.

Tabla 4.10. Condiciones de linealidad de las extracciones, recuperaciones y coeficientes de variación (n=5) para los 3 niveles de contaminación en muestras blancas de Grano y Paja extraídas con los dos métodos escogidos. Se han subrayado los datos que no cumplen los criterios.

Nº Herbicida	GRANO									PAJA								
	%TR 50 ppb	%CV (n=5)	%TR 150 ppb	%CV (n=5)	%TR 250 ppb	%CV (n=5)	Cf. Lin.	b	±t*Sb	%TR 50 ppb	%CV (n=5)	%TR 150 ppb	%CV (n=5)	%TR 250 ppb	%CV (n=5)	Cf. Lin.	b	±t*Sb
1 Dicamba	86,61	13,78	84,42	10,94	85,81	8,61	98,5	0,86	0,17	97,66	16,55	86,13	<u>17,62</u>	87,96	16,66	96,5	0,85	0,38
2 2,4-D	94,71	10,19	96,15	11,95	91,32	9,84	95,9	0,90	0,47	108,57	15,64	100,14	11,03	99,55	6,87	99,2	0,97	0,10
3 MCPP	87,12	14,82	89,56	11,86	87,43	8,75	97,8	0,87	0,24	94,08	14,33	94,85	10,61	93,64	11,78	99,0	0,94	0,12
4 Diclorprop p	85,53	14,40	84,23	4,71	86,34	8,52	98,0	0,87	0,22	91,90	13,37	92,46	11,92	95,13	1,50	98,0	0,96	0,24
5 MCPA	90,64	3,76	98,72	8,82	95,68	8,03	96,5	0,97	0,43	92,64	15,95	91,17	9,84	88,12	2,59	97,8	0,87	0,25
6 Amidosulfuron	93,70	15,14	95,53	11,30	90,35	8,44	95,6	0,89	0,50	93,65	13,32	101,68	12,35	100,61	8,95	98,2	1,02	0,24
7 Tribenuron m.	104,52	10,71	98,40	13,83	105,25	5,01	<u>94,5</u>	1,05	0,73	105,01	16,91	94,79	9,73	95,00	8,35	98,2	0,93	0,22
8 Fenoxaprop p	96,68	13,23	93,48	3,05	91,62	6,00	99,1	0,90	0,11	98,92	17,20	87,50	11,86	90,1	8,85	96,0	0,88	0,45
9 Diclofop	103,69	12,34	98,19	12,28	102,57	5,98	96,1	1,02	0,50	86,03	13,59	86,11	11,37	92,48	10,65	95,2	0,94	0,58
10 Flamprop	100,62	17,23	95,33	<u>15,49</u>	93,38	11,55	99,3	0,92	0,09	94,44	11,88	97,52	8,48	96,65	7,64	98,9	0,97	0,14
11 Bromoxinil	99,25	12,34	96,10	10,94	99,18	6,12	97,3	0,99	0,34	94,25	10,67	94,33	11,09	92,56	1,96	98,6	0,92	0,17
12 Ioxinil	102,13	14,25	104,21	12,11	101,55	7,81	97,8	1,01	0,29	97,46	15,96	97,94	10,53	102,95	5,25	96,6	1,04	0,45
13 Cianazina	91,34	16,25	90,44	<u>15,71</u>	92,04	3,30	98,6	0,92	0,16	96,57	16,05	98,85	14,92	103,04	12,23	97,4	1,05	0,34
14 Terbutilazina	101,45	4,21	107,65	7,25	106,75	4,01	98,5	1,08	0,20	110,08	9,04	108,66	4,71	101,50	2,92	95,0	0,99	0,63
15 Terbutrina	102,76	15,31	91,18	12,14	97,05	13,70	<u>93,8</u>	0,96	0,76	101,29	16,82	94,37	11,70	94,51	12,91	98,8	0,93	0,14
16 Metribuzina	113,07	10,79	<u>112,38</u>	5,15	<u>110,25</u>	4,54	98,8	1,10	0,17	84,81	13,27	85,68	11,13	88,79	6,20	97,6	0,90	0,27
17 Carfentraz. e.	107,80	13,78	106,29	12,06	<u>117,31</u>	8,75	<u>93,1</u>	1,20	1,05	95,14	14,73	98,09	11,84	90,09	2,39	<u>93,0</u>	0,89	0,79
18 Metoxuron	87,65	16,84	85,24	11,87	89,55	2,15	96,1	0,90	0,44	109,40	16,02	<u>111,00</u>	14,45	102,37	11,78	<u>93,5</u>	1,01	0,83
19 Isoproturon	94,82	14,68	100,61	8,84	95,44	3,22	95,2	0,96	0,58	83,44	15,94	89,91	10,27	92,37	6,46	99,2	0,95	0,10
20 Clortoluron	108,43	12,76	94,75	6,95	96,04	3,21	96,9	0,93	0,36	99,05	14,01	105,24	12,23	99,54	6,25	95,0	1,00	0,64
21 Metabenzot.	102,24	14,52	100,27	9,13	101,25	4,80	99,0	1,01	0,13	87,22	18,66	95,57	<u>17,66</u>	97,03	13,81	99,9	0,99	0,01
22 Linuron	88,70	17,15	86,78	13,75	81,64	6,90	95,8	0,80	0,42	84,53	17,05	86,38	<u>17,97</u>	83,52	13,61	97,3	0,83	0,29
23 Tralkoxidim	90,20	14,28	96,58	13,86	94,83	0,61	97,8	0,96	0,27	89,84	12,67	88,19	14,78	90,79	<u>17,00</u>	97,7	0,91	0,27
24 Flamprop isop.	112,12	10,27	109,26	9,74	107,58	7,81	99,2	1,06	0,10	96,17	10,13	<u>110,41</u>	11,59	105,18	9,07	<u>94,5</u>	1,07	0,75
25 Mefenpir dietil	108,33	7,81	91,26	9,31	91,85	1,84	96,6	0,88	0,37	102,45	16,82	96,32	11,20	96,65	12,26	98,8	0,95	0,14
26 MCPA tioetil	106,91	5,68	100,74	8,45	98,77	0,74	99,4	0,97	0,07	96,66	11,31	89,60	8,45	82,64	3,83	<u>94,9</u>	0,79	0,51
27 Bifenox	83,55	9,15	96,24	9,30	97,76	1,31	99,5	1,01	0,07	79,47	14,50	82,63	10,33	92,21	8,92	<u>93,2</u>	0,95	0,82
28 Fenoxaprop p e.	95,56	11,04	94,11	8,47	89,75	5,05	96,6	0,88	0,38	95,08	10,19	95,94	6,33	99,60	5,29	97,5	1,01	0,32
29 Diclofop metil	109,50	6,01	97,95	8,65	96,68	0,68	99,2	0,93	0,09	106,59	12,18	99,85	13,50	99,38	7,37	99,4	0,98	0,08
30 Prosulfocarb	112,72	9,12	105,18	9,54	102,38	0,16	99,0	1,00	0,12	103,90	17,47	95,82	11,30	89,65	2,16	96,2	0,86	0,42
31 Trialato	104,43	9,85	90,57	9,94	90,42	3,77	97,8	0,87	0,25	89,81	15,66	94,41	10,11	98,93	3,92	97,4	1,01	0,33
32 Diflufenican	110,34	7,27	94,08	8,19	98,78	1,98	<u>94,0</u>	0,96	0,73	89,22	11,55	88,20	11,52	86,41	2,82	98,7	0,86	0,15
33 Pendimetalina	105,02	5,28	98,65	8,80	98,99	1,69	98,9	0,97	0,14	93,43	14,84	85,49	9,13	87,51	9,41	96,9	0,86	0,34
34 Trifluralina	92,83	6,97	90,04	9,68	91,17	1,70	98,7	0,91	0,15	108,14	16,73	95,48	10,04	95,82	2,02	97,7	0,93	0,27
35 MCPP isooct.	105,62	15,46	100,61	6,87	97,86	1,71	98,7	0,96	0,16	109,90	9,72	97,87	11,64	105,75	10,95	<u>92,9</u>	1,05	0,95
36 Bromoxinil oct.	99,64	13,75	100,22	<u>18,95</u>	92,55	10,84	<u>93,8</u>	0,91	0,72	111,39	11,61	98,66	14,43	97,25	12,54	99,1	0,94	0,10
37 Ioxinil oct.	110,88	17,32	<u>110,11</u>	14,92	105,42	<u>15,57</u>	96,8	1,04	0,42	107,87	12,88	97,65	10,98	97,01	6,91	98,9	0,94	0,13
Criterios	70-120	<20	70-110	<15	70-110	<15	>95			70-120	<20	70-110	<15	70-110	<15	>95		

Precisión

Se realizó para los tres niveles en que se habían hecho los estudios de recuperación, en condiciones de repetibilidad y en condiciones de precisión intermedia, es decir, variando los reactivos y los días de análisis, para las muestras de grano y paja.

Tabla 4.11. Valores de la precisión combinada para los 3 niveles a los que se estudió la recuperación y precisión en las muestras de Grano y Paja para los dos métodos escogidos. Se han subrayado los que no cumplen los criterios

N°	Herbicida	GRANO			PAJA		
		CV total (50ppb)	CV total (150ppb)	CV total (250ppb)	CV total (50ppb)	CV total (150ppb)	CV total (250ppb)
1	Dicamba	18,12	11,15	8,89	19,89	<u>18,50</u>	<u>16,79</u>
2	2,4-D	13,91	13,34	10,59	20,20	12,31	7,57
3	MCP	19,63	12,57	9,11	16,82	11,36	12,42
4	Diclorprop p	18,95	4,80	8,83	15,42	12,50	1,61
5	MCPA	4,99	10,06	8,93	18,53	10,18	2,53
6	Amidosulfuron	20,69	12,61	9,00	15,60	13,93	10,00
7	Tribenuron metil	15,48	<u>15,74</u>	6,00	21,39	10,39	8,91
8	Fenoxaprop p	18,35	3,29	6,50	20,91	11,89	9,07
9	Diclofop	17,71	13,89	6,94	15,03	12,30	11,14
10	Flamprop	<u>24,40</u>	<u>17,16</u>	12,62	13,92	9,20	8,27
11	Bromoxinil	17,33	12,22	7,00	12,49	11,74	2,00
12	Ioxinil	20,29	<u>14,41</u>	9,11	19,14	11,54	5,95
13	Cianazina	21,94	<u>16,84</u>	3,58	19,14	<u>16,50</u>	13,97
14	Terbutilazina	5,98	8,79	4,85	11,77	5,62	3,28
15	Terbutrina	21,93	13,05	<u>15,46</u>	20,74	12,49	13,79
16	Metribuzina	16,15	6,44	5,60	14,57	11,50	6,31
17	Carfentrazona etil	20,14	<u>14,51</u>	11,37	17,42	12,98	2,37
18	Metoxuron	<u>22,33</u>	12,14	2,24	20,84	<u>17,53</u>	13,32
19	Isoproturon	20,12	10,21	3,57	17,39	10,49	6,72
20	Clortoluron	18,73	7,65	3,58	17,03	<u>14,21</u>	6,90
21	Metabenzotiazuron	20,73	10,52	5,59	20,88	<u>18,97</u>	<u>15,06</u>
22	Linuron	<u>22,86</u>	<u>14,27</u>	7,10	18,73	<u>18,10</u>	13,90
23	Tralkoxidim	19,12	<u>15,52</u>	0,67	14,40	<u>14,89</u>	<u>17,61</u>
24	Flamprop isopropil	15,32	11,98	9,52	12,05	13,94	10,47
25	Mefenpir dietil	11,50	10,04	1,95	20,91	12,15	13,27
26	MCPA tioetil	8,20	9,75	0,80	13,53	8,62	7,30
27	Bifenox	11,86	10,43	1,48	15,42	11,20	9,33
28	Fenoxaprop p etil	15,21	9,27	5,33	11,96	6,81	5,80
29	Diclofop metil	8,90	9,77	0,68	15,47	<u>15,07</u>	8,12
30	Prosulfocarb	13,71	11,39	0,12	21,87	12,21	2,15
31	Triallato	14,17	10,63	3,97	17,83	10,79	4,32
32	Diflufenican	10,72	8,94	2,17	13,09	11,66	8,20
33	Pendimetalina	7,54	10,05	1,83	17,34	10,70	9,47
34	Trifluralina	9,41	10,26	1,83	21,57	10,77	2,16
35	MCP isooctílico	<u>22,40</u>	7,89	1,93	12,68	12,74	12,75
36	Bromoxinil octanoato	19,34	<u>21,86</u>	11,78	15,30	<u>15,92</u>	13,66
37	Ioxinil octanoato	<u>25,82</u>	<u>18,52</u>	<u>18,63</u>	16,50	11,95	7,53
	Criterios	<22	<14	<14	<22	<14	<14

Los valores encontrados de la precisión combinada (Tabla 4.11) cumplieron, en general, los criterios establecidos [44], siendo ligeramente superiores en el caso del nivel de 150 ppb para las muestras de paja, posiblemente debido a que esta matriz estaba más afectada por las interferencias.

En general, la precisión fue peor para las muestras de grano y paja que para las del suelo a los mismos niveles de concentración (Tabla 3.13), ya que son muestras que estaban más afectadas por el efecto matriz.

Estrictamente el análisis llevado a cabo en los dos laboratorios no es comparable y no puede usarse como una medida de la precisión interlaboratorio, ya que debido a que el equipamiento usado era diferente, hubo que adaptar los métodos a las posibilidades de cada sitio y las pruebas no se desarrollaron en condiciones análogas.

4.3.3.5. Incertidumbre

Tabla 4.12. Incertidumbres relativas encontradas para los tres niveles de concentración e incertidumbre relativa máxima para las muestras de Grano y Paja.

Nº	Herbicida	GRANO				PAJA			
		I rel 50 ppb	I rel 150 ppb	I rel 250 ppb	I rel max	I rel 50 ppb	I rel 150 ppb	I rel 250 ppb	I rel max
1	Dicamba	17,10	13,89	10,68	17,10	19,90	21,12	19,55	21,12
2	2,4-D	13,21	14,78	12,05	14,78	18,81	13,74	8,72	18,81
3	MCP	18,28	14,73	10,79	18,28	17,58	13,33	14,00	17,58
4	Diclorop p	18,09	8,49	10,92	18,09	16,73	14,97	4,68	16,73
5	MCPA	8,00	11,60	10,22	11,60	19,52	12,84	5,55	19,52
6	Amidosulfuron	18,45	14,05	10,41	18,45	16,50	15,03	10,83	16,50
7	Tribenuron metil	13,50	16,74	6,67	16,74	20,25	12,40	10,27	20,25
8	Fenoxaprop p	16,33	6,37	7,88	16,33	20,67	14,77	10,85	20,67
9	Diclofop	15,53	15,34	8,23	15,53	17,33	14,77	13,27	17,33
10	Flamprop	20,64	18,54	13,79	20,64	14,89	10,98	9,48	14,89
11	Bromoxinil	15,47	13,81	8,17	15,47	13,84	13,96	4,94	13,96
12	Ioxinil	17,38	14,85	9,76	17,38	19,33	13,26	7,05	19,33
13	Cianazina	19,70	18,95	5,32	19,70	19,38	17,93	14,47	19,38
14	Terbutilazina	7,40	9,53	5,64	9,53	11,60	7,12	4,77	11,60
15	Terbutrina	18,50	15,00	16,21	18,50	20,18	14,50	15,33	20,18
16	Metribuzina	13,40	7,51	6,22	13,40	16,74	14,20	8,33	16,74
17	Carfentrazona etil	16,67	14,63	10,47	16,67	17,99	14,55	4,66	17,99
18	Metoxuron	20,54	14,97	4,94	20,54	19,25	17,30	14,03	19,25
19	Isoproturon	17,91	11,34	5,24	17,91	19,60	13,06	8,33	19,60
20	Clortoluron	15,85	10,16	6,17	15,85	17,46	15,19	8,60	17,46
21	Metabenzotiazuron	17,64	11,64	6,52	17,64	22,44	20,99	16,33	22,44
22	Linuron	20,77	16,87	9,08	20,77	20,77	21,49	16,27	21,49
23	Tralkoxidim	17,60	16,79	3,88	17,60	15,90	17,94	20,03	20,03
24	Flamprop isopropil	12,96	12,27	9,78	12,96	13,26	14,17	11,10	14,17
25	Mefenpir dietil	10,80	12,52	5,45	12,52	20,39	14,30	14,88	20,39
26	MCPA tioetil	8,69	11,19	4,42	11,19	14,54	11,55	6,80	14,54
27	Bifenox	12,73	12,11	4,34	12,73	18,37	13,56	11,15	18,37
28	Fenoxaprop p etil	14,01	11,05	6,93	14,01	13,09	8,94	6,92	13,09
29	Diclofop metil	9,23	11,74	5,16	11,74	15,31	16,75	9,79	16,75
30	Prosulfocarb	15,11	15,79	11,12	15,79	23,29	18,04	12,93	23,29
31	Trialato	12,75	12,96	6,28	12,96	19,26	13,05	6,17	19,26
32	Diflufenican	10,26	11,38	5,42	11,38	15,22	14,97	6,52	15,22
33	Pendimetalina	8,36	11,59	4,58	11,59	18,30	12,33	11,84	18,30
34	Trifluralina	10,21	12,55	4,69	12,55	20,05	12,82	4,66	20,05
35	MCP isoocílico	18,60	9,35	4,18	18,60	12,36	14,38	13,04	14,38
36	Bromoxinil octanoato	17,18	22,66	13,57	22,66	14,68	17,75	15,30	17,75
37	Ioxinil octanoato	20,63	17,81	18,21	20,63	15,70	13,61	8,75	15,70

Se calculó la incertidumbre relativa para los 3 niveles de contaminación, cubriendo el rango validado por el procedimiento optimizado. Las contribuciones que se tuvieron en cuenta para su cálculo fueron las mismas que para las muestras de suelo, detalladas en el Apartado 3.3.4.7.

Con estos valores se calculó la incertidumbre asociada a cada concentración de la validación y se halló la incertidumbre relativa, es decir, el porcentaje de la incertidumbre expandida dividida por la concentración a la que se había calculado. Se aplicaba la máxima incertidumbre obtenida por el procedimiento anterior, a todos los valores de extracciones de herbicidas en muestras de grano y paja a lo largo de este estudio. De esta forma, al aplicar la incertidumbre máxima, los resultados estaban lo suficientemente “protegidos”.

La mayoría de las incertidumbres relativas encontradas fueron menores del 20% para la mayoría de herbicidas (Tabla 4.12). Los valores obtenidos son mayores que los de suelo (Tabla 3.15), porque, como ya se ha visto a lo largo de toda la validación, las muestras de cebada estaban más afectadas por las interferencias que las de suelo.

4.4. CONCLUSIONES

Como resultado de la modificación del método *QuEChERS* para muestras secas y la comparación con procedimientos multiresiduo clásicos para herbicidas en muestras de cebada, realizada en el Departamento de Plaguicidas y Contaminantes de RIKILT, se extraen las siguientes conclusiones:

1. La modificación realizada en el método *QuEChERS* para optimizar la extracción de un gran número de herbicidas en muestras de cebada, es adecuada puesto que es el único método que proporciona recuperaciones medias en torno al 60-70% para todos los compuestos, exceptuando aquellos afectados por las interferencias de la matriz. Esto demuestra que aunque es un método muy simple, la adición de modificadores orgánicos y sales aumenta las recuperaciones de analitos de muy diferentes características. Sin embargo, los resultados no son tan buenos como para validar el procedimiento ya que los residuos de herbicidas se unen fuertemente a la matriz seca de la cebada, y se necesitaría incrementar la fuerza del disolvente, el tiempo de extracción o un ambiente más ácido o básico para conseguir una extracción completa. De hecho, recientemente se ha modificado el método original, utilizando sales de citrato, para llevar a cabo la extracción de muestras donde los residuos están más enlazados, como en los granos de cereales [50,51].
2. Todos los herbicidas no polares se recuperan bien con todos los procedimientos, siendo su extracción incrementada cuando se usan disolventes apolares y no se incluyen etapas de limpieza del extracto. La eficiencia en su recuperación es: mini Luke > acetona > *QuEChERS* > acetato de etilo. Las menores recuperaciones con el acetato de etilo se explican por las pérdidas que sufren algunos analitos en el proceso de limpieza por GPC, y otros en la doble evaporación del disolvente.
3. La eficiencia en la recuperación de herbicidas ácidos es contraria a la recuperación de los apolares: *QuEChERS* = acetato de etilo > mini Luke > acetona, y los resultados son inaceptablemente bajos para todos los métodos estudiados.
4. El método *QuEChERS* proporciona extractos limpios debido a que el acetonitrilo extrae menos co-extractos lipofílicos en comparación con la acetona o el acetato de etilo, la adición del NaCl controla la cantidad de componentes de la matriz extraídos, y se retienen ácidos grasos y otros ácidos orgánicos en la limpieza con PSA. El acetato de etilo es más efectivo en impedir la extracción de azúcares, pero también extrae más interferencias de la matriz, sobre todo comparado con la acetona, por lo que se introduce la limpieza con GPC. El reparto de la acetona con el diclorometano y el éter de petróleo es selectivo para disminuir los co-extractos polares, aunque no se observan diferencias al compararlo con los extractos obtenidos a partir de la acetona sin reparto.

De la posterior adaptación de los métodos en función de las posibilidades de equipamiento del Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL, se extraen las siguientes conclusiones:

5. En el análisis por GC-MS no existen los problemas derivados de la mala deconvolución de algunos picos como con el TOF-MS, ni permanecen atrapados en el liner del PTV, lo que permite el análisis de algunos analitos problemáticos por cuadrupolo en todos los métodos.
6. Se aprecia en el ITACyL la misma tendencia en la recuperación de los analitos en función de su polaridad observada para la comparación de métodos desarrollada en el RIKILT.

7. Las recuperaciones obtenidas para los herbicidas ácidos en el ITACyL son análogas a las obtenidas en el RIKILT, por lo que el análisis de los ésteres metílicos por GC para los ácidos, en lugar del uso de LC-(ESI)-MS/MS, es válido.
8. El método *QuEChERS* proporciona recuperaciones medias aceptables para todos los analitos pero algo menores para los herbicidas más volátiles, ya que es necesario concentrar el extracto antes de su análisis, a pesar del uso del etilénglicol y las bajas temperaturas al evaporar.
9. Las bajas recuperaciones de analitos neutros y básicos con el método del acetato de etilo, son debidas a pérdidas que se producen en la limpieza por GPC y en la doble evaporación de los extractos, ya que cuando se eliminan estos pasos las recuperaciones son cercanas al 100%. Por tanto, es el método escogido para los herbicidas básicos y neutros ya que proporciona las mejores recuperaciones. También son satisfactorias las obtenidas con el mini Luke pero necesita de un reparto para eliminar el agua, mientras que el acetato de etilo es prácticamente inmisible con ella y la separación se produce en una única etapa. Aunque no se incluye la limpieza por GPC, los analitos están afectados por el efecto matriz en la misma medida que con otros métodos con etapas de limpieza.
10. Los herbicidas ácidos únicamente presentan recuperaciones aceptables con el método mini Luke con ajuste de pH antes del reparto, ya que se reparten así en los disolventes apolares, y, por tanto, es el método escogido para estos analitos.
11. El reparto de la acetona con el diclorometano y el éter de petróleo es el más selectivo para disminuir los co-extractos polares, lo que justifica que muchos menos herbicidas están afectados por el efecto matriz en comparación con la extracción en acetona sin reparto, que extrae muchas interferencias polares desde la matriz.
12. El efecto del tampón en el extracto durante el método *Buffered QuEChERS* proporciona peores resultados que el método *QuEChERS* original, sobre todo para los ácidos.
13. En el caso de las muestras de paja, las recuperaciones son algo mayores respecto de las extracciones en grano, de manera más acusada para los herbicidas de polaridad media y los apolares que para los ácidos.
14. La limpieza con PSA elimina ligeramente el color amarillo de los extractos de las muestras de *QuEChERS*, pero el efecto no se aprecia demasiado en los cromatogramas. Algunos analitos dan más problemas en el análisis del método que incluye la limpieza por PSA, ya que este adsorbente elimina componentes de la matriz que proporcionan una protección adecuada a los analitos en el sistema de inyección y la columna cromatográfica.
15. En general, se obtienen peores recuperaciones para las muestras de paja, pero los resultados son más parecidos a los de las muestras de grano para los dos métodos escogidos, que por tanto, son los más robustos. En general, no existen diferencias apreciables entre las muestras de grano y de paja, aunque estas últimas contienen más interferencias, por lo que parece que el efecto matriz depende más del método que se utiliza que del tipo de muestra.
16. Todos los herbicidas están afectados por el efecto matriz independientemente del tipo de muestra, del procedimiento de extracción usado, y de si incluyen o no etapa de limpieza, por lo que siempre se utilizan los calibrados en matriz para evitar resultados erróneos al cuantificar las muestras, según las recomendaciones europeas.

17. Los dos métodos escogidos, el del acetato de etilo para herbicidas básicos y neutros, y el mini Luke con ajuste de pH antes del reparto para los herbicidas ácidos, se validan hasta 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, proporcionando recuperaciones adecuadas y buena precisión.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

1. "Chapter 2: General Analytical, Operations and Information". Pesticide Analytical Manual, Food and Drug Administration, FDA, Vol. 1, 3rd Edition. EEUU. 1994. Revisado en 1999.
2. E. Primo Yúfera, J.M. Carrasco Dorrien. "Química Agrícola II: Plaguicidas y Fitorreguladores". Editorial Alhambra. 1977.
3. R. de Prado, J.V. Jorrín. "Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI". Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2001.
4. M. W. Skidmore. *Pure & Appl. Chem.* 70 (7) (1998) 1423.
5. J. Tekel, S. Hatrik. *J. Chromatogr. A.* 754 (1996) 397.
6. S.J. Lehotay. *J. AOAC Int.* 83 (3) (2000) 680.
7. C. Sánchez-Brunete, B. Albero, J.L. Tadeo. "Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS)". 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. Almería. 2003.
8. K. Mastovska. "Food & Nutritional Analysis: Pesticide Residues". En "Encyclopedia of Analytical Science". P. Worsford, A. Townshead, C. Poole (Eds.). Academic Press. 2004.
9. S.J. Lehotay. "Strategies for Multiclass, Multiresidue Analysis of Plaguicidas. Encyclopedia of Analytical Chemistry". R. Meyers (Ed.). John Wiley & Sons. 2000.
10. J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández. *J. Chromatogr. A.* 882 (1-2) (2000) 175.
11. K. Mastovska, S.J. Lehotay. *J. Chromatogr. A.* 1040 (2004) 259.
12. P.A. Mills, J.J. Onley, R.A. Gaither. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46 (1963) 186.
13. M.A. Luke, J.E. Frohberg, H.T. Masumoto. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58 (1975) 1020.
14. M.A. Luke, J.E. Frohberg, G.M. Doose, H.T. Masumoto. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64 (1981) 1187.
15. F. Schenck, P. Callery, P. Gannett, J. Daft, S. Lehotay. *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1177.
16. J. Sherma, D. C. Sherma. *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1303.
17. "Analytical Methods for Pesticide Residue in Foodstuffs". 6th ed. General Inspectorate for Health Protection, Ministry of Health, Welfare and Sport. The Hague. The Netherlands. 1996.
18. W. Specht. "Method S19, organochlorine, organophosphorus, nitrogen-containing and other pesticides". En "Deutsche Forschungsgemeinschaft: Manual of Pesticide Residue Analysis". H.P. Thier, H. Zeumer (Edit.). DFG Pesticides Commission, VCH Weinheim 1 (1987) 383 y 2 (1992) 317.
19. W. Krijgsman, C.G. van de Kamp. *J. Chromatogr. A.* 117 (1976) 201.
20. M. Godula, J. Hajslova, K. Mastouska, J. Krivankova. *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 355.

21. Rapport 17/98, "Pesticide Analytical Methods in Sweden", Part 1. National Food Administration. Uppsala. 1998.
22. "Método IA –Multirresiduo". Plan Nacional de Investigación de Residuos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España. 1995.
23. A.H. Roos, A.J. van Munsteren, F.M. Nab, L.G.M.Th Tuinstra. *Fresen. Z. Anal. Chem.* 322 (1985) 443.
24. J. Fillion, F. Sauvé, J. Selwyn. *J. AOAC Int.* 83 (2000) 698.
25. J. Klein, L. Alder. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 1015.
26. Publicaciones del Journal of AOAC International, <http://www.aoac.org/pubs/pubjaoac.html>.
27. "Pesticide Analytical Manual. Volume 1, Multiresidue Methods", 3rd edition. FDA, Washington, DC, EEUU. 1994.
28. Documento No. SANCO/825/00 rev.7. European Commission, Bruselas. 2004.
29. W. Specht, S. Pelz, W. Gilsbach. *Fresen. J. Anal. Chem.* 353 (1995) 183.
30. A. Andersson, H. Pålsheden. *Fresen. J. Anal. Chem.* 339 (1991) 365.
31. M.L. Hopper. *J. AOAC Int.* 75 (1992) 707.
32. J. Tekel, J. Kovacicová. *J. Chromatogr. A.* 643 (1993) 291.
33. M. Gamón Vila. "Programa de vigilancia español de residuos de plaguicidas en vegetales. Diseño, metodología analítica y resultados". I Congreso Nacional de Laboratorios Agroalimentarios. Lugo. 2004.
34. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
35. S. Mitra (Ed.). "Sample preparation techniques in analytical chemistry". Wiley. 2003.
36. S.J. Lehotay, A. de Kok, W. Hiemstra, T. van Bodegraven. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 595.
37. S.J. Lehotay. "Results from the AOAC Collaborative Study on the QuEChERS Method and New Developments". International Symposium of Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries. 2005.
38. S.J. Lehotay. *J. Chromatogr. A* 785 (1997) 289.
39. S.J. Lehotay, K. Mastovska, M. Lightfield. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615.
40. M. Anastassiades. "QuEChERS, A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products". CRL meeting. Stuttgart. 2005.
41. S.J. Lehotay, A. Lightfield, J. Harman-Fetcho, D. Donoghue. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4589.
42. C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza. *J. Chromatogr. A,* 1131 (2006) 11.
43. EPA Method 8151A, "Chlorinated Herbicides by GC using methylation or pentafluorobenzoylation derivatization". 1996.

44. Documento N° SANCO/10476/2003, de 5 de febrero de 2004, de la Comisión Europea, "Quality control procedures for pesticide residue analysis". Bruselas. 2004. Actualizado por medio del Documento N° SANCO/10232/2006, de 24 de Marzo de 2006. Última actualización: N° SANCO/2007/3131, de 31 de Octubre de 2007.
45. S.J. Lehotay. "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues". En "Methods in Biotechnology, Pesticide Analysis". J.L. Martínez-Vidal, G. Frenich (Eds.). Humana Press, Totowa, NJ. 2005.
46. C.D.S. Tomlin (Ed.). "The Pesticide Manual", Version 2.1, British Crop Protection Council, Farnham. 2001.
47. M.J.M. Wells, L.Z. Yu. J. Chromatogr. A 885 (2000) 237.
48. M. Anastassiades, K. Mastovska, S.J. Lehotay. J. Chromatogr. A 1015 (2003) 163.
49. J.J. Guitián. "Registro de Productos Fitosanitarios". Departamento de Pesticidas. Subdirección General de Medios de Producción Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2002-2008.
50. M. Anastassiades, B. Tasdelen, E. Scherbaum, D. Stajnbaher. "Recent developments in *QuEChERS* methodology for pesticide multiresidue analysis". En "Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety". H. Ohkawa, H. Miyagawa, P.W. Lee (Eds). Wiley-VCH, Weinheim. 2007.
51. P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba. Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 1697.

CAPÍTULO 5:
ENSAYOS DE DISIPACIÓN DE HERBICIDAS
EN CAMPO

ÍNDICE

5.1. Introducción	199
5.1.1. Persistencia y Disipación.....	199
5.1.2. Mecanismos de Disipación.....	199
5.1.2.1. Procesos de Degradación.....	200
5.1.2.2. Procesos de Transporte.....	201
5.1.2.3. Procesos de Acumulación.....	202
5.1.3. Factores que regulan la Disipación de los Herbicidas en el Suelo	203
5.1.3.1. Propiedades del Herbicida.....	203
5.1.3.2. Características del Suelo.....	206
5.1.3.3. Influencia del Medio y de las Prácticas Agronómicas	207
5.1.4. Ensayos de Disipación.....	208
5.1.4.1. Tipos de Ensayos.....	208
5.1.4.2. Legislación sobre Ensayos.....	209
5.1.5. Cinéticas de Disipación	210
5.1.5.1. Tipos de Cinéticas	210
5.1.5.2. Cálculo de DT ₅₀ y DT ₉₀	212
5.1.6. Objetivos.....	214
5.2. Material y Métodos	215
5.2.1. Diseño de los Ensayos en Campo.....	215
5.2.1.1. Parcela	215
5.2.1.2. Selección de Herbicidas.....	217
5.2.2. Tratamientos	219
5.2.3. Muestras de Suelo.....	221
5.2.3.1. Diseño del Muestreo	221
5.2.3.2. Pretratamiento y Extracción de Residuos en Suelo.....	223
5.2.3.3. Cálculo de la Cantidad Inicial de Herbicida en el Suelo	224
5.2.3.4. Cálculo de las Cinéticas de Disipación y DT ₅₀ -DT ₉₀	225
5.2.4. Muestras de Cebada.....	227
5.2.4.1. Diseño del Muestreo	227
5.2.4.2. Pretratamiento y Extracción de Residuos en Cebada	228
5.3. Resultados y Discusión	229
5.3.1. Cinéticas de disipación y DT ₅₀ -DT ₉₀ en suelo	229
5.3.1.1. 1 ^{er} Ensayo: 2002-2003 y 2 ^{do} Ensayo: 2003-2004.....	232
5.3.1.2. 3 ^{er} Ensayo: 2004-2005	255
5.3.2. Residuos en Cebada.....	273
5.4. Conclusiones	274
5.5. Bibliografía	277

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. PERSISTENCIA Y DISIPACIÓN

La *Persistencia* de un herbicida en el medio ambiente viene determinada por su resistencia a la degradación que depende de la cantidad y la forma de distribución del herbicida, su reactividad en el medio ambiente y las condiciones del medio. Se define, según el Anexo VI de la Directiva 91/414/CEE, como el tiempo de residencia de una materia activa en un determinado compartimento del medio ambiente.

La persistencia de los herbicidas en la capa arable del suelo es un factor clave en la eficacia de los mismos. El herbicida ideal debe perdurar lo suficiente como para asegurar un buen control de las malas hierbas en un periodo aceptable, pero sin comprometer el desarrollo de los cultivos en rotación que pudieran ser sensibles al producto aplicado. Así ha existido una preocupación creciente por evitar el uso de herbicidas muy persistentes y que se adsorban fuertemente a la matriz del suelo, a favor de otros compuestos que se degradan más rápidamente y que generalmente son más móviles, pudiendo causar contaminación de las aguas.

La *Disipación* se refiere a un término genérico que describe el tiempo que necesita una sustancia para desaparecer de un compartimento mediante procesos de disipación. En el suelo es el resultado de la combinación de una serie de mecanismos que incluyen tanto los procesos de transferencia (volatilización, lixiviación, erosión, adsorción por las plantas), como los de degradación (microbiana, fotólisis o hidrólisis). Si los procesos de transporte (volatilización y lixiviación principalmente) son mínimos o pueden despreciarse, la disipación se debe exclusivamente a la degradación.

Conociendo las características del herbicida es posible predecir su comportamiento, aunque sólo de una forma general, ya que el sistema suelo-clima-compuesto es muy complejo y muy variable tanto temporal como espacialmente. Esto lleva a la necesidad de recurrir a procedimientos empíricos, que incluyen medidas en campo y en laboratorio, si se quiere conocer la disipación de un compuesto concreto en un suelo determinado.

La información que proporcionan los estudios de persistencia y disipación debe ser suficiente para permitir la evaluación del destino y el comportamiento de la sustancia activa en el medio ambiente y para evaluar el riesgo sobre las especies no diana, sus metabolitos y los productos de degradación cuando son peligrosos medioambientalmente [1]. Uno de los parámetros más importantes en el proceso de registro de los fitosanitarios en la UE es la tasa de disipación de los compuestos en el medio ambiente para poder evaluar el posible riesgo ambiental y la posible contaminación de los acuíferos. La persistencia de los herbicidas se expresa normalmente en forma de su vida media, es decir, el tiempo requerido para que se degrade la mitad del herbicida aplicado.

5.1.2. MECANISMOS DE DISIPACIÓN

Algunos compuestos quedan adsorbidos mayoritariamente en la capa arable, en función del contenido en arcilla y materia orgánica donde se puede producir una descomposición química, microbiológica o por acción de la radiación solar, o una volatilización que se potencia por la mayor temperatura y humedad en esa capa. Sin embargo, cuando los compuestos penetran en el suelo, su persistencia puede ser prolongada como resultado del bajo nivel de actividad microbiana y la total ausencia de iluminación. En esas condiciones se produce una unión muy fuerte entre el suelo y el

residuo del herbicida, que puede llegar a originar problemas de acumulación. Los procesos que influyen en el transporte en el subsuelo incluyen la absorción por las plantas, adsorción y desorción por la materia orgánica, las arcillas y las superficies minerales, la difusión en fase vapor, o el transporte en la fase acuosa, que ocasionalmente puede llegar hasta las aguas freáticas.

Por tanto, la disipación de un herbicida en el suelo estará influida por procesos de degradación, transporte y acumulación.

5.1.2.1. Procesos de Degradación (Figura 5.1)

La degradación se considera como la única vía para que un herbicida sea totalmente eliminado del medio ambiente. En un suelo agrícola se puede producir a través de procesos tanto abióticos o fisico-químicos, como la hidrólisis o la fotólisis; como bióticos, mediante los microorganismos del suelo y las enzimas extracelulares. Ambos procesos ocurren simultáneamente en el medio y, aunque en ciertos casos predomina la transformación abiótica, es generalmente aceptado que es la transformación biótica la que controla la degradación de los herbicidas en los sistemas naturales [2]. Los organismos superiores también pueden metabolizar estos compuestos pero juegan un papel menor en su biodegradación.

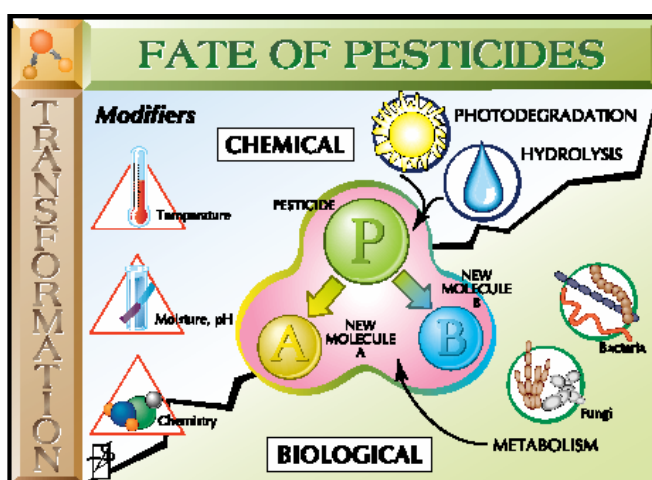


Figura 5.1. Representación de los procesos de degradación de los plaguicidas.

La intensidad de los procesos de degradación vendrá determinada por las propiedades del compuesto, las características del suelo y las condiciones ambientales. Todos los suelos no tienen la misma capacidad de degradación, dependerá de su composición físico-química y de la microflora presente [3].

Normalmente los productos de degradación iniciales son menos tóxicos que el propio herbicida, pero a veces su toxicidad es parecida o mayor. En algún punto de la degradación, los productos que se forman ya no suponen un riesgo porque ya no son biológicamente activos, ni tóxicos. La degradación completa de los herbicidas se llama mineralización, pero raramente se conoce cuándo y cómo se produce. Sus productos son dióxido de carbono, agua y minerales que incluyen azufre, fósforo, nitrógeno y elementos halogenados.

5.1.2.2. Procesos de Transporte (Figura 5.2)

El potencial de los herbicidas para desplazarse fuera de su zona de aplicación depende de las propiedades químicas y de la formulación del herbicida, de las propiedades del suelo, del modo y el grado de aplicación, de las condiciones climatológicas y de la profundidad de las aguas subterráneas.

Los más volátiles tienen mucha tendencia a liberarse a la atmósfera y si son persistentes, se mueven a largas distancias. Si son muy solubles en agua pueden lixiviarse con el agua de lluvia dando lugar a la contaminación de los acuíferos y presentar un problema para los organismos acuáticos. Si, por el contrario, son muy insolubles en agua, suelen adherirse al suelo, donde están menos disponibles para los organismos.

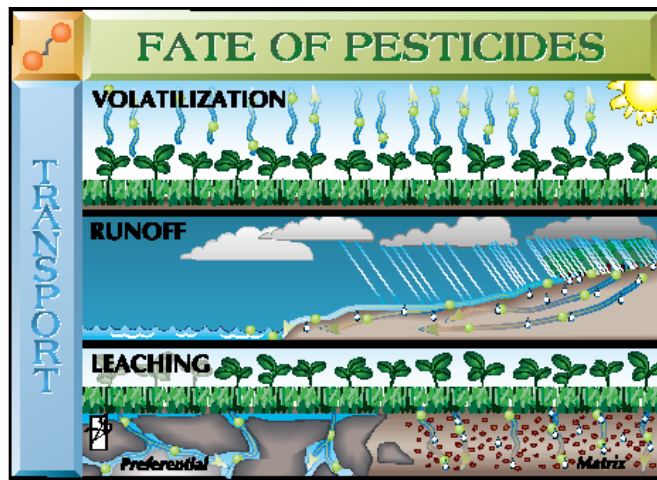


Figura 5.2. Representación de los procesos de transporte de los plaguicidas.

Los principales procesos de transporte son:

- **La Volatilización**, es la pérdida del compuesto en forma de vapor desde la superficie de tratamiento. Un fitosanitario cuando es aplicado al suelo se distribuye entre la fase sólida, la acuosa y el aire. Los herbicidas tienen diferente tendencia a volatilizarse en función de su presión de vapor, así como de las propiedades del suelo, su adsorción, su solubilidad en agua, y las condiciones climatológicas, que son las que más influyen. La cantidad que queda en la fase gaseosa viene determinada por la constante de Henry. Conocer la volatilidad de un fitosanitario tiene una importancia trascendental para su adecuado manejo.
- **La Difusión**, es el movimiento de moléculas a causa de un gradiente de concentración. Este movimiento es al azar pero trae como consecuencia el flujo de materiales desde las zonas más concentradas a las menos concentradas. Se produce en el aire y el agua y sólo se mueven distancias cortas. Otra forma habitual de movimiento en el medio edáfico es la **Dispersión**, mediante la cual el fluido sigue un camino tortuoso alrededor de las partículas del suelo en el que, en último término, se produce un transporte neto de material de zonas de altas concentraciones a zonas de bajas concentraciones. Para medir la difusión de un compuesto en el suelo hay que considerar la interacción conjunta de parámetros tales como la porosidad, el factor de tortuosidad, los procesos de adsorción, la naturaleza del compuesto, etc.

- **La Lixiviación**, es el transporte de un herbicida en el suelo, por disolución o arrastre mecánico, es decir, se produce bajo la influencia del agua. El grado de lixiviación está influido por las características físico-químicas del suelo, la solubilidad del producto, la frecuencia e intensidad de la lluvia, etc. Es el parámetro más importante de evaluación del movimiento de una sustancia en el suelo, puesto que determina la contaminación de las aguas.

5.1.2.3. Procesos de Acumulación (Figura 5.3)

La retención se refiere a la capacidad del suelo de inmovilizar un herbicida en la zona y no permitir su transporte. Generalmente, se describe como adsorción, al proceso reversible o irreversible por el que un compuesto químico es atraído por la superficie de las partículas del suelo y retenido en ella durante un tiempo más o menos largo dependiendo de la afinidad del compuesto por dicha superficie [4].

La adsorción, por tanto, retarda o previene el movimiento de los herbicidas y afecta a su disponibilidad, tanto para las plantas y microorganismos, como para la transformación biótica o abiótica. Su cuantificación permite estimar el riesgo potencial de los agroquímicos sobre el ambiente, por lo que los fenómenos de adsorción y desorción de diferentes herbicidas en el suelo y su influencia sobre el medio ambiente, se han estudiado intensamente en las últimas décadas [5-7].

Depende tanto de las propiedades químicas del herbicida (solubilidad en agua, polaridad) como de las propiedades del suelo (contenido en materia orgánica y arcilla, pH, características de carga de la superficie, permeabilidad). Para la mayoría de herbicidas, la materia orgánica y la arcilla son las componentes más importantes que controlan la retención de los compuestos orgánicos en el suelo. La presencia en el suelo de numerosos tipos de sitios de adsorción incrementa el grado de degradación de los herbicidas.

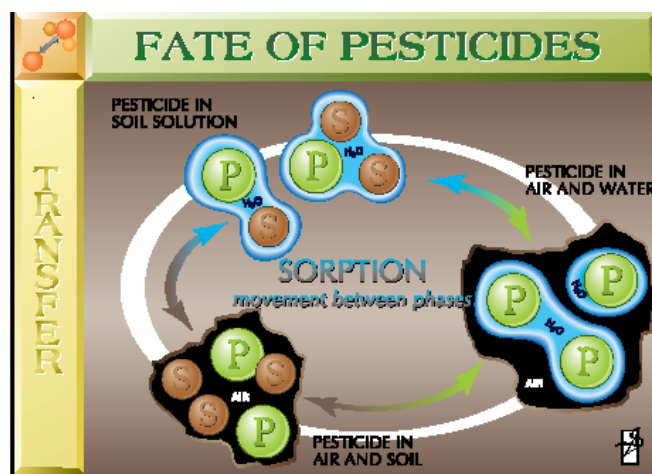


Figura 5.3. Representación de los procesos de retención de los plaguicidas.

Las uniones entre los herbicidas y el suelo son más o menos fuertes y evolucionan con el tiempo. A medida que los herbicidas encuentran más difícil volver a la disolución acuosa del suelo, una fracción de estos herbicidas ya no puede extraerse y se estabiliza en el suelo uniéndose a ciertos constituyentes, principalmente la materia orgánica. Es lo que se conoce como **Envejecimiento**. Estos “residuos no extraíbles”, también llamados “residuos ligados”, se consideran como la fracción de los herbicidas más fuertemente

estabilizada en el suelo, que en la mayoría de los casos no se podrá recuperar y no se liberará ni siquiera tras aumentar el tiempo o la intensidad de la extracción [8]. Esta resistencia se cree es debida a la mayor adsorción a los coloides del suelo y a la difusión hacia el interior de las partículas húmicas.

5.1.3. FACTORES QUE REGULAN LA DISIPACIÓN DE LOS HERBICIDAS EN EL SUELO

Además del gran número de procesos que afectan al destino de los herbicidas, hay muchos factores que afectan a la cinética de estos procesos. Las diferencias en la estructura química, las propiedades y condiciones del suelo, el clima, la presencia o ausencia de cultivos y microorganismos, además de las prácticas agronómicas, pueden afectar a la cinética de los procesos y al destino de los herbicidas en el suelo, añadiendo complejidad a las interacciones [4].

La estructura química del herbicida gobierna su reactividad, su eficacia, así como su movilidad y degradación. Las propiedades químicas, tales como su solubilidad en agua, su presión de vapor y su polaridad, afectan a su comportamiento en el medio ambiente. De la misma forma, le afectan las propiedades del suelo como el contenido en materia orgánica, la textura, especialmente el contenido en arcilla, el pH, la capacidad de intercambio catiónico, su humedad, su estado de oxidación y su localización. Las condiciones del suelo se ven asimismo afectadas por las características climatológicas, como la temperatura, las precipitaciones, el viento y la radiación. Por último, la variedad de plantas en función de su crecimiento y la presencia de distintos tipos de microorganismos son variables adicionales que afectan al herbicida en el medio ambiente.

5.1.3.1. Propiedades del Herbicida

La persistencia en el suelo de un herbicida está relacionada con sus propiedades que sirven como primera aproximación para conocer que procesos están implicados en la disipación. Un compuesto persistente es aquel que no se hidroliza o degrada rápidamente, es poco volátil, poco soluble en agua, y, por tanto, tiene poca tendencia a moverse [4].

Las principales propiedades de los herbicidas de estudio se detallaron en la Tabla 2.1. Como ampliación se han incluido datos relativos a la movilidad, adsorción, volatilización, persistencia y degradación en la Tabla 5.1, únicamente para los herbicidas que se usaron en los ensayos en campo.

Los compuestos de **Estructura** estable son más persistentes. Las características del herbicida que están asociadas generalmente con una mayor adsorción son la elevada masa molecular, la tendencia a formar iones y la presencia de grupos químicos que incrementen la afinidad de la molécula por la superficie del suelo.

La **Volatilidad** se mide a partir de la constante de Henry que depende de la presión de vapor en estado líquido y de la solubilidad en agua. La adsorción en el suelo es un proceso importante que disminuye la volatilización. Otros factores que influyen en ella son el método de aplicación del herbicida, la temperatura y humedad del suelo, el contenido en materia orgánica del suelo, la textura, la porosidad, la persistencia residual y la lixiviación.

El **Coefficiente de reparto octanol-agua (K_{ow})** mide la hidrofobicidad (o la lipoafinidad) de un compuesto, de tal forma que cuanto menos ionizada está una molécula, más tenderá a ser adsorbida en una superficie hidrofóbica desde una

disolución polar. Este coeficiente se ha utilizado como medida de la adsorción de los compuestos no-iónicos al suelo, siendo principalmente adsorbidos por la materia orgánica.

La **Solubilidad** en agua está relacionada con la lixiviación, el grado de adsorción, la movilidad en el medio ambiente, la absorción por las plantas y la persistencia [4]. Es un factor trascendente por dos razones fundamentales, la fase líquida del suelo es una fase acuosa, lo que condiciona la dinámica del herbicida asociado a dicha fase, y los herbicidas con mayor carácter contaminante, son poco solubles en agua.

El **Coefficiente de Reparto o Adsorción (Kd)**, representa la relación entre la concentración del herbicida adsorbida en el suelo y la concentración del herbicida que queda en la disolución del suelo. Es el parámetro más sensible para predecir el transporte y el destino de los herbicidas en éste. Está relacionado con el potencial de bioacumulación (tendencia de los compuestos a acumularse en los organismos) y con la adsorción por la materia orgánica [4]. Si es pequeño, indica una alta movilidad.

Coefficiente de Reparto Normalizado (Koc), normaliza el coeficiente de adsorción refiriéndolo al contenido en carbono orgánico, ya que es la característica que más influye en la adsorción de las moléculas orgánicas, pudiendo correlacionarse con ésta y no con otras características del suelo. No es apropiado para los herbicidas iónicos, ya que los mecanismos electrostáticos priman en esas circunstancias, siendo el intercambio iónico con las superficies de las arcillas cargadas negativamente el mecanismo de adsorción preferente de estos compuestos.

La adsorción de un compuesto en el suelo es el mayor determinante de su potencial para lixivarse. Gustafson desarrolló un índice de lixiviación basado en la persistencia en el suelo y la adsorción, denominado **índice GUS (Ground-water Ubiquity Store)**, que utiliza la vida media y Koc para su cálculo, por lo que es más adecuado para los compuestos no iónicos [9]. Basado en este índice se ha propuesto un potencial de lixiviación, en el que los compuestos con índice mayor a 2,8 son potencialmente lixiviables, mientras que los inferiores a 1,8 no lo son.

Hay que tener en cuenta, que la vida media de un herbicida no es siempre la misma, varía sobre todo con la temperatura y la humedad, por tanto, un herbicida aplicado en una determinada época del año puede tener diferente coeficiente GUS que si es aplicado en otra época, y por consiguiente, puede ser considerado lixiviable o no dependiendo de las condiciones meteorológicas.

Constantes de acidez y basicidad, pKa, pKb, parámetros significativos para los herbicidas que se comportan como ácidos y bases débiles, ya que determinan el rango de pH en que se comportan como especies neutras o ionizadas. La ionización está relacionada con las rutas y mecanismos de adsorción, persistencia e interacción con otras especies moleculares [4]. Depende del pH del suelo, que afecta a la adsorción y a la movilidad. Las especies aniónicas que tienen una carga negativa al pH del suelo (como los fenoxiácidos) suelen ser potencialmente lixiviables.

Por último, la **Presentación del herbicida** tiene un marcado efecto sobre su persistencia, según sea en emulsión, polvo, granulada, etc. La más persistente es la granular que además permite la aplicación del producto sobre la superficie del suelo sin necesidad de incorporación. Esta práctica aumenta la persistencia de los herbicidas al reducir las pérdidas por volatilización, degradación fotoquímica o ambas.

Tabla 5.1. Datos relativos a la movilidad, adsorción, volatilidad, persistencia y degradación para los herbicidas ensayados en el Campo y su interpretación [10].

Tipo	Herbicida	MOVILIDAD				ADSORCIÓN				VOLATILIDAD			
		mg/l H ₂ O 20°C	Interpr. [11]	GUS	Interpr. [11]	Koc	Kf	1/n	Interpr. [11]	P.vapor (mPa) 25°C	Cte Henry	Interpr. [11]	
Ácidos	Dicamba	5500	Muy Alta	3,31	Muy lixiviable	13	0,21	1,36	Muy móvil	4,5	6,10E-05	Moderada	
	2,4-D	44558	Muy Alta	2,25	Estado de transición	56	0,75	0,80	Móvil	0,0187	1,30E-05	No volátil	
	MCP	250000	Muy Alta	2,29	Estado de transición	31	0,41		Muy móvil	1,6	2,20E-04	Moderada	
	MCPA	294000	Muy Alta	2,51	Estado de transición	74	1,19	0,75	Móvil	0,0023	5,50E-05	No volátil	
	Diclofop												
	Flamprop	18,2	Moderada							0,000239	4,32E-07	No volátil	
	Bromoxinil	90	Moderada	0,01	Poco lixiviable	174	7,05	0,96	Moderada	0,17	5,30E-04	No volátil	
Ioxinil	3034	Alta	1,21	Lixiviable	276	3,47	0,92	Moderada	0,00204	1,50E-05	No volátil		
Básicos	Terbutrina	22	Moderada	1,31	Poco lixiviable	2000		0,76	Poco móvil	0,225	1,50E-03	Moderada	
Neutros	Isoproturon	70,2	Moderada	2,00	Estado de transición	139	13,68	0,80	Moderada	0,00505	1,46E-05	No volátil	
	Flamprop isop.	12	Moderada	1,96	Estado de transición	750			Poco móvil	0,085	2,58E-03	Moderada	
	Fenoxaprop p e.	0,7	Baja	0,02	Poco lixiviable	11354	3,9	0,79	Inmóvil	0,00053	2,74E-04	No volátil	
	Mefenpir dietil	20	Moderada	1,49	Poco lixiviable	634			Poco móvil	0,0063	2,55E-04	No volátil	
	Diclofop metil	0,8	Baja	-0,36	Poco lixiviable	16000	134,80	0,92	Inmóvil	0,25	1,96E-01	Moderada	
	Trialato	4	Baja	1,19	Poco lixiviable	2400			Poco móvil	16	1,22E+00	Volátil	
	Pendimetalina	0,33	Baja	-0,39	Poco lixiviable	15744		0,90	Inmóvil	1,94	2,73E-03	Volátil	
	MCP												
	Bromoxinil oct.									1		Moderada	
Ioxinil oct.	< 0,05	Muy Baja							1		Moderada		
Tipo	Herbicida	PERSISTENCIA						DEGRADACIÓN					
		DT ₅₀ Lab 20°C		DT ₅₀ Campo		DT ₉₀ Campo	Interpr. [11]	DT ₅₀ Fotólisis	Mineralización	DT ₅₀ Hidrólisis			
Ácidos	Dicamba	48		14,1	14-42	14		No Persistente	502		28		
	2,4-D	31	13,67 (2-59)	10	9,9 (4,6-17,2)	46	10	30	No Persistente	13	36% (114d)	Estable	
	MCP	8,2	6,3-8,2			7-21	21		No Persistente	42	52% (91d)	Estable	
	MCPA	24	7-41	25		10-180	25	30	No Persistente	0,04	54% (91d)	28	
	Diclofop					10-30							
	Flamprop												
	Fenoxaprop p	5-42				5-14			No Persistente				
Bromoxinil	1		8		7			No Persistente	0,5		Estable		
Ioxinil	6		5					No Persistente	5		Estable		
Básicos	Terbutrina	74		52		42		Persistente			Estable		
Neutros	Isoproturon	12	7,2-18,2	23	12-33			120-300	34-68	Mod. Persist.	48	10-22% (100d)	1560
	Flamprop isop.												
	Fenoxaprop p e.	0,51					9			No Persistente	105		23,2
	Mefenpir dietil			17,5						No Persistente	198		41
	Diclofop metil	50		75			37			Persistente	22		32
	Trialato	40		46, >30	48-56	82	90-120		Persistente	1			168
	Pendimetalina	123	72-172	90	30-150, 155	30-60	90	90-360	>360	Persistente	21	1,7-2,4% (91d)	Estable
	MCP												
	Bromoxinil oct.	2-5					7			No Persistente			
Ioxinil oct.	2-5								No Persistente				
Referencias		[10]	91/414/EC	[10]	91/414/EC	[12]	[13]	[10]	91/414/EC				

5.1.3.2. Características del suelo

El contenido en materia orgánica de un suelo, su textura (principalmente su contenido en arcilla) y el pH, son las propiedades del suelo más directamente relacionadas con el modo de acción de los herbicidas en el mismo. Los suelos ricos en coloides (principalmente arcilla y materia orgánica) adsorben más fuertemente a los herbicidas, con la consiguiente disminución de las pérdidas por lixiviación y volatilización.

La **Textura**, condiciona la porosidad y la estructura. La primera influye en la capacidad de percolación o penetración, mientras que la segunda, afecta a la aireación y, por ello, a la degradación por oxidación.

Las **Arcillas** influyen en la adsorción de los herbicidas en función de su diferente capacidad de adsorción, de la naturaleza de su silicato, de la densidad de carga laminar y de la naturaleza de los cationes de cambio. El grado en que las arcillas contribuyen a la adsorción depende de la relación entre arcillas y materia orgánica en el suelo y de la naturaleza de ésta [14].

Los suelos arenosos son inertes desde el punto de vista químico, carecen de propiedades coloidales y de reservas de nutrientes, además de presentar mala estructuración, buena aireación, muy alta permeabilidad y nula retención de agua. Por el contrario los suelos arcillosos son muy activos desde el punto de vista químico, adsorben iones y moléculas, floculan y dispersan, son muy ricos en nutrientes, retienen mucha agua, son suelos bien estructurados, pero impermeables y asfixiantes. Los suelos limosos tienen nula estructuración, sin propiedades coloidales, son impermeables y con mala aireación. Por último, los suelos francos son equilibrados con propiedades compensadas.

Varios estudios sugieren que los contaminantes orgánicos presentan más afinidad por las superficies orgánicas que por las minerales [15]. La **Materia orgánica** del suelo es el factor más importante para la retención de los herbicidas apolares [16]. El contenido en materia orgánica actúa en un doble sentido ya que, si es activa, es decir, con alta actividad microbiana, se favorece la degradación de los herbicidas. Sin embargo, como habitualmente también posee una capacidad de adsorción elevada, favorece la retención de los herbicidas, que son menos degradados al no estar en disolución [17]. Con respecto a la adsorción existe un cierto conflicto, ya que no siempre protege a un herbicida de la degradación, ni tampoco siempre lo lleva a degradarse más. En principio, reduciría la degradación al encontrarse el herbicida menos en contacto con la disolución del suelo, sin embargo, al ser la densidad de microorganismos cerca de las superficies de los coloides mayor que en la disolución del suelo, y como los lugares de adsorción puede que catalicen reacciones no biológicas, las moléculas de herbicida adsorbidas se degradarían más rápidamente.

El proceso de adsorción resulta de un intercambio de cargas [18]. La **Capacidad de Cambio** de las sustancias húmicas de la materia orgánica es más elevada que la de los minerales de la arcilla y tienen además una superficie específica mayor, por tanto son más activas, lo que implica que a mayor contenido en materia orgánica más capacidad tendrá el suelo de fijar herbicidas.

El **pH** del suelo afectará directamente a la degradación de un herbicida si la estabilidad de este producto es dependiente del pH, e indirectamente por el efecto en la adsorción o sobre la composición microbiológica del suelo. La adsorción de ciertos herbicidas aumenta al bajar el pH del suelo. Su efecto está directamente asociado al pKa del herbicida, a la carga variable del suelo, y al potencial redox del mismo, que es la causa de ciertos procesos degradativos de estos compuestos.

Por último, los *Microorganismos* del suelo también ejercen un papel fundamental en la degradación de los herbicidas en el suelo.

5.1.3.3. Influencia del Medio y de las Prácticas Agronómicas

La volatilización de los herbicidas se incrementa con la *Temperatura*, así como su metabolización. Al mismo tiempo, aumenta la pérdida de agua del suelo dejando más centros activos libres para unirse al herbicida, aumentando la adsorción y disminuyendo la volatilización.

La *Humedad* es una variable muy importante ya que determina el rendimiento de un herbicida, controlando los niveles de oxígeno del suelo y abasteciendo los requerimientos de agua necesarios para los microorganismos. Es un factor esencial ya que un adecuado valor de ésta y de la temperatura asegura una actividad microbiológica adecuada. Además, el agua actúa como un disolvente y agente de transporte, como medio para procesos biológicos y no biológicos y es un agente de las reacciones hidrolíticas.

En general la humedad del suelo produce una menor adsorción inicial del herbicida, ya que compite con los herbicidas no iónicos por los sitios de adsorción, aumenta la difusión, la asimilación del producto por las plantas, y la volatilización, al unirse más moléculas de agua al suelo ocupando los sitios de adsorción [19]. El agua está adsorbida muy fuertemente en los lugares de adsorción del coloide por ser un compuesto muy polar. Por ello los contenidos bajos en humedad provocan una fuerte retención del agua, que deja pocos sitios activos libres para que el herbicida pueda adsorberse [20]. La retención de los compuestos orgánicos por los constituyentes minerales y orgánicos depende de la humedad del suelo [21]. En suelos secos, la adsorción de compuestos orgánicos resulta fundamentalmente de las interacciones del herbicida con los componentes minerales, mientras que en suelos húmedos, es la materia orgánica la que tienen un papel más importante. Esto es debido a la fuerte interacción de dipolo entre la fracción mineral del suelo y las moléculas de agua, la cual excluye a los compuestos orgánicos, especialmente los poco solubles en agua, de esta fracción del suelo. Así la solubilidad del herbicida en el agua sería uno de los principales factores que afectan al fenómeno de adsorción.

Se ha señalado que la humedad favorece los procesos de disipación de herbicidas, llegando a demostrar que para numerosos herbicidas existe una relación lineal entre los tiempos de residencia medios y el contenido de humedad del suelo. La razón está justificada en asumir que el proceso de degradación ocurre en la fase líquida con mayor facilidad, ya que en la fase adsorbida está muy impedido [17,22].

La presencia de *Cubierta vegetal*, sobre todo tubérculos, provoca una disminución del contenido en herbicidas del suelo, ya que asimilan parte de estos productos aumentando su tasa de degradación, llegándose a comprobar que la cantidad de residuos de un producto en un suelo desnudo es siempre mayor que en un suelo cultivado. Los cultivos pueden modificar la temperatura y la humedad de la porción de suelo que cubren y por lo tanto variar la tasa de degradación de los herbicidas. Además la presencia de raíces afecta a la actividad microbiológica del suelo.

Análogamente, la adición de *Enmiendas al suelo*, normalmente sustratos orgánicos fácilmente degradables y nutrientes minerales, potencia la degradación al incrementar notablemente la actividad microbiológica, aunque no se puede adoptar como regla general.

5.1.4. ENSAYOS DE DISIPACIÓN

La complejidad del sistema suelo-clima-compuesto hace que haya que desarrollar ensayos en laboratorio y en campo, si se quiere conocer la disipación de un compuesto concreto en un suelo determinado.

5.1.4.1. Tipos de Ensayos

Existen varias alternativas para el estudio del sistema suelo-clima-compuesto, que normalmente se han llevado a cabo cubriendo un amplio rango de condiciones experimentales que utilizan, en orden de complejidad, botes (*batch*), columnas saturadas [23], columnas insaturadas de mayor tamaño [24], lisímetros [25], dispositivos con macroporos y suelo inalterado [26], y ensayos en campo [27-29]. Se plantea así el problema del cambio de escala, de tal manera que al avanzar hacia situaciones más representativas de escenarios reales, y, por tanto, más complejas, se pierde el control sobre las condiciones experimentales y la posibilidad del estudio aislado de los procesos que tienen lugar [30].

La realización de *Ensayos de Laboratorio* en condiciones controladas ha proporcionado información sobre el comportamiento de solutos en el suelo, útil para el conocimiento de los mecanismos de transporte y reactividad [31,32]. Normalmente se toman suelos representativos caracterizados en función de sus propiedades, y se incuban en botes en condiciones de temperatura y humedad establecidas. Pueden aplicarse residuos marcados con isótopos (^{14}C).

Una situación intermedia es el uso de *Contenedores* donde se hace crecer el cultivo en condiciones ambientales [33,34]. Se rellenan con suelo que se acondiciona para la ocasión, lo que disminuye su representatividad.

Se han realizado también numerosos estudios de degradación de herbicidas en *Columnas de suelo o Lisímetros* a la intemperie [30]. Están diseñados para controlar las características de lixiviación de la sustancia y sus metabolitos, de tal forma que se evalúa la probabilidad de que se contamine el agua subterránea. La ventaja de estos sistemas es que las condiciones de experimentación son mucho más parecidas a las condiciones reales presentes en condiciones de campo. Están basados en el tratamiento de columnas no perturbadas de suelo y permiten recoger las aguas que lixivian por debajo de la profundidad del lisímetro, así como muestrear periódicamente el suelo para analizar el contenido en herbicida. La variabilidad es menor que en los estudios de campo, siendo más representativos que los estudios de laboratorio, aunque tienen algunas limitaciones como su tamaño reducido frente a los ensayos en campo, el efecto borde, las dificultades para extrapolar los datos, y la alta inversión que precisan.

Los *Ensayos en Campo* se llevan a cabo para demostrar los procesos de transformación, transporte y evolución de los herbicidas en condiciones reales. Son necesarios para comprobar los valores encontrados en los ensayos en laboratorio, ya que los resultados no pueden ser transferidos directamente a escenarios de campo sin ciertas restricciones debido a que los cambios en las condiciones climáticas pueden afectar decisivamente al comportamiento en el suelo del herbicida aplicado, lo que hace muy difícil las predicciones.

Una de las ventajas del uso de los DT_{50} hallados en los ensayos en campo en lugar de los obtenidos en los estudios en el laboratorio es que se determinan en las condiciones específicas para el campo y se acercan mucho más a la situación real ya que reflejan las variaciones debidas a los cambios estacionales [35]. Las discrepancias entre los valores

predichos y los observados pueden deberse al uso de parámetros de disipación para predecir la persistencia en el campo derivados de los ensayos en el laboratorio que llevan a sobrestimar los valores de los residuos en condiciones reales de campo [36]. Los parámetros del laboratorio no representan bien las condiciones exteriores debido a la incubación a temperatura y humedad constantes frente a las dinámicas en el campo, a la ausencia de plantas, ya que éstas aumentan la biodegradación, y a la preparación de los suelos antes de su uso en los ensayos, lo que provoca la disminución de los microorganismos que provoca que la degradación de los herbicidas sea menor y se sobrestimen los tiempos de vida media [1].

En muchos casos la información que ofrecen las casas comerciales es insuficiente para definir el comportamiento de cada producto en los diferentes tipos de suelo. Es de interés el disponer de información real sobre sus posibilidades de utilización en diversos lugares, ya que muchas veces los estudios están realizados sobre suelos, cultivos y condiciones ambientales muy diferentes a las de utilización.

Los estudios de disipación de herbicidas en campo suelen ser largos y costosos ya que normalmente incluyen la aplicación extensiva del herbicida con un equipamiento calibrado en fincas agrícolas o parcelas experimentales representativas cultivadas o en barbecho, y a las que se suelen aplicar prácticas agronómicas convencionales. Después del tratamiento se realiza un seguimiento de los contenidos herbicidas en el suelo con objeto de conocer las causas de su desaparición.

Los ensayos en campo suelen llevarse a cabo para [37]:

- Determinar el perfil de disipación de residuos en el aire, suelo y agua medioambientales.
- Determinar el nivel de residuos que permanecen en el suelo en función de los cultivos.
- Determinar el nivel máximo de residuos que se puede esperar en los cultivos, parámetro que se usa para determinar el LMR.
- Determinar el plazo de seguridad antes de la cosecha o entrada del ganado.
- Determinar el comportamiento de los residuos en las plantas en función del tiempo.

Su gran debilidad es que el perfil de disipación observado del herbicida y su transporte, es el resultado de muchos parámetros altamente variables, de tal manera que estudios similares llevados a cabo en diferentes sitios, o en el mismo sitio en diferentes años, pueden ser altamente variables [38].

5.1.4.2. Legislación sobre Ensayos

Dentro del proceso europeo de autorización de los herbicidas según la Directiva 91/414/CEE, se exige que los fabricantes evalúen, entre otros, los riesgos medioambientales para el suelo mediante el desarrollo de estudios de persistencia y disipación, con el objetivo de garantizar un nivel elevado de protección y evitar la autorización de fitosanitarios cuyos riesgos para la salud, las aguas subterráneas y el medio ambiente no hayan sido objeto de investigaciones apropiadas. La relación de los estudios necesarios está recogida en el documento de la Comisión Europea 7109/VI/94.

Existen una serie de guías para el desarrollo de ensayos en campo, las cuales se han consultado en el desarrollo de este trabajo. A nivel europeo, se utilizan principalmente los documentos que desarrollan la Directiva 91/414/CEE, como el Documento 9188/VI/97 rev. 8 de 2000 [1], o la guía de la SETAC [39], referida principalmente a la

guía EPPO [40]. A nivel español se ha transpuesto la normativa europea mediante la Orden de 4 de agosto de 1993, por la que se establecen los requisitos para solicitudes de autorizaciones de productos fitosanitarios, el RD 822/1993, de 28 de mayo, rev. 3 de 2004, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos, y la Orden de 11 de diciembre de 1995, por la que se establecen las disposiciones relativas a las autorizaciones de ensayos y experiencias con productos fitosanitarios. EEUU y Canadá comparten normativa [41,42] que ha sido recientemente revisada [43]. A nivel internacional, existen numerosas organizaciones que se han dedicado al tema, como la OECD [44], la FAO [45,46], la GIFAP [47] o la IUPAC [48].

Resultados de los Ensayos: Criterios para la Autorización

En el Anexo VI la Directiva 91/414/CEE, principios uniformes de evaluación y autorización de productos para la protección de las plantas, se expone que, “no se autorizarán los productos de protección de las plantas si el DT_{50} en campo es mayor de 3 meses y el DT_{90} es mayor de un año o se generan residuos no extraíbles mayores del 70% con un grado de mineralización menor del 5% en 100 días en los ensayos en el laboratorio”. Tampoco si existe perjuicio para los cultivos siguientes, ni efectos indeseables para el medioambiente, etc.

5.1.5. CINÉTICAS DE DISIPACIÓN

La finalidad de los estudios de persistencia es determinar la cinética de la disipación producida por el efecto combinado de todos los procesos que afectan a los herbicidas en el suelo.

5.1.5.1. Tipos de Cinéticas

Se han utilizado varias cinéticas para describir la disipación de los herbicidas en el suelo. Las más usadas por autores que realizan estudios semejantes a los planteados en este trabajo para ajustar los datos obtenidos, son las de primer orden, segundo orden y biexponenciales [49-51].

Para calcular los parámetros de las cinéticas de disipación de los herbicidas en el suelo, se ha usado la guía FOCUS (*FOrum for the Co-ordination of pesticide fate models and their Use*) [52], grupo de trabajo de expertos constituido en 1993 para ayudar en el cálculo de las cinéticas de disipación necesarias para el proceso europeo de autorización de plaguicidas según la Directiva 91/414/CEE.

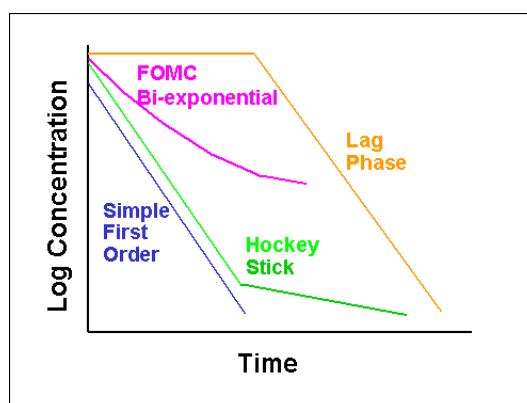


Figura 5.4. Comparación de algunas de las cinéticas usadas para ajustar los datos de los ensayos de campo [52].

Los principales tipos de cinéticas que se describen en el documento de FOCUS son las de primer orden, tres bifásicas y dos que explican la disipación con periodo de latencia (Figura 5.4). Adicionalmente se ha utilizado la cinética de segundo orden. Se presenta un resumen de las ecuaciones de todos los modelos en la Tabla 5.2.

Cinética de **Primer Orden ó SFO (Single First Order)**, asume que el número de moléculas de herbicida es muy pequeño frente al número de microorganismos y enzimas que los degradan. Como resultado, el cambio en la concentración del herbicida es directamente proporcional a la concentración que queda de él en el sistema ya que el resto de componentes están en exceso. Se da en ausencia de crecimiento microbiano ya que se asume que no hay limitación en los microorganismos que degradan. Supone que la mineralización está limitada a una cantidad máxima que dependerá de la naturaleza del herbicida y del tipo de suelo. Hill *et al* (1955) [53], fue el primer autor que utilizó esta cinética para describir la degradación de una Fenilurea en suelo.

Las desviaciones de la cinética de primer orden se producen porque la disponibilidad del herbicida disminuye con el tiempo, por la variación espacial del proceso de degradación o por la dependencia del proceso de degradación con la disminución de la actividad microbiana. La disipación de trazas de residuos de herbicidas suele acercarse a una asíntota mayor que cero, y en esta situación, la cinética de primer orden primero sobrestima, suponiendo una disminución en la concentración de residuos más lenta en las primeras etapas, y luego subestima las concentraciones reales.

Debido a su simplicidad se ha utilizado extensamente en el pasado aunque su uso sistemático ya no está recomendado. Las ecuaciones se convertían en su forma lineal mediante un artificio matemático antes ajustar los datos [54], pero esta aproximación asignaba pesos diferentes a los datos y producía malos ajustes en algunos casos.

Si se ven implicadas las concentraciones de otros componentes, el orden cambia desde uno a otro diferente, normalmente al de **Segundo Orden ó SSO (Single Second Order)** si hay implicadas dos concentraciones en la degradación. Supone una disminución en la concentración de residuos más rápida al principio y más lenta al final.

Si uno de los componentes está en exceso y el cambio en su concentración es despreciable, la cinética de segundo orden pasa a una de pseudo-orden uno.

Cinéticas Bifásicas

Las cinéticas bifásicas se caracterizan por una disipación inicial rápida seguida de una disminución sustancial, lo que produce que los residuos permanezcan en el suelo por periodos de tiempo más o menos elevados. Las ecuaciones bifásicas se ajustan mejor a los datos observados que las de primer o segundo orden.

El comportamiento bifásico suele deberse al envejecimiento de los residuos, una adsorción no lineal, la disminución de los microorganismos, sobre todo en los estudios en laboratorio [55], las variaciones espaciales en la parcela experimental, y los cambios en las condiciones meteorológicas debido a las estaciones. En el suelo los herbicidas se distribuyen entre la fase sólida y la líquida, y es esta partición la que implica una descripción bifásica de la degradación, ya que se ha propuesto que únicamente está disponible para degradarse la fracción de herbicida en la disolución del suelo [17,22]. Esta fracción disponible disminuye con el tiempo debido a que la adsorción y los procesos de difusión se hacen más lentos, lo que también disminuirá, consecuentemente, su degradación con el tiempo [56].

Existen un gran número de modelos bifásicos, seleccionándose para este estudio aquellos que tienen un menor número de parámetros, ya que son más sencillos. Se describen a continuación:

Cinética de **Gustafson y Holden ó FOMC (First-Order Multi-Compartment model)** [57], en la que se propone que el grado de degradación en el suelo es variable, debido a que es un medio heterogéneo y, por tanto, es muy improbable que la degradación se produzca de la misma manera en sus distintas regiones. Esto se traduce en la división del suelo en un gran número de sub-compartmentos no conectados, en los que se degrada el sustrato mediante una constante de primer orden diferente en cada uno de ellos, y que en conjunto están descritos por una cinética bifásica. La disipación aumenta cuando aumenta el valor de α y el de β disminuye, siendo ambos parámetros de la cinética.

Cinética de **Modelo Biexponencial ó DFOP (Double-First-Order in Parallel model)** [58], es un modelo de degradación empírico que surge de la combinación de los modelos de primer y segundo orden [59]. Cabe destacar el caso de $K_1 > 0$ y $K_2 < 0$, en el cual se aprecia una evolución de tipo sigmoide (lag phase) característica de una degradación microbiana. Cada tramo de la curva representa distintas etapas en la degradación: período de acomodación y adaptación, período de velocidad constante y período de finalización o latencia [60].

Cinética del **Modelo de Palo de Hockey, HS (Hockey Stick) ó FOTC (First Order Two Compartments)**, en la que se considera que el suelo consiste en dos compartimentos diferentes, uno de degradación rápida y otro más lenta, cada uno afectado por una cinética de orden 1. Inicialmente se aplica todo el producto en el compartimento de degradación rápida donde la concentración del herbicida disminuye mediante una cinética de orden 1 con una K_1 , y en un determinado momento llamado punto de ruptura (t_b), comienza a transferirse al compartimento de degradación lenta, mediante otro proceso de orden 1 con una constante K_2 . Esta es la principal diferencia con los otros dos modelos bifásicos expuestos, en los que el compuesto aplicado se divide directamente entre los dos compartimentos, sin que exista transferencia de uno a otro. Normalmente K_1 es mayor que K_2 , ya que la degradación es más rápida al principio.

Cinéticas con periodos de latencia (Lag Phase)

Las concentraciones del herbicida son constantes (periodo de latencia) durante un periodo de tiempo que se produce después de una disminución de primer orden o bifásica. En ocasiones puede deberse a artificios, como una mala conservación de las muestras en los experimentos en laboratorio, en la que produce una disminución de la actividad microbiana. En los ensayos en campo puede deberse a procesos de pérdida producidos por la fotólisis en la superficie del suelo, pérdidas por volatilización o lixiviación, o una adaptación de los microorganismos.

5.1.5.2. Cálculo de DT_{50} , DT_{90}

Un parámetro muy importante para dar una primera aproximación sobre la persistencia de un herbicida en el medio ambiente, es el tiempo medio de disipación del herbicida en el suelo (DT_{50}), tiempo expresado en días que tarda el residuo de un herbicida en llegar al 50% de su depósito en la matriz estudiada. Le influyen factores como el pH del suelo, la temperatura, la incidencia solar, la humedad, el potencial redox, el tipo de microorganismos o la biodisponibilidad.

Hasta hace poco se utilizaba el tiempo de vida media, en el cual la degradación del herbicida se describía exclusivamente mediante una cinética de primer orden. Actualmente se recomienda más usar el DT₅₀ ya que asume cualquier modelo de disipación.

El valor de DT₅₀ derivado de las cinéticas bifásicas suele ser menor que el de primer orden, mientras que es al revés en el caso de DT₉₀.

Las DT₅₀-DT₉₀ del modelo DFOP, han de calcularse mediante cálculo iterativo, ya que al ser biexponencial, no existe una ecuación diferencial autónoma y no hay un procedimiento analítico para calcular los puntos de disipación.

En el caso de la cinética HS, cada compartimento tiene DT₅₀- DT₉₀ propias y diferentes. La primera fase de disminución está controlada por la fase de disolución rápida, donde domina la DT_{fast}. La segunda fase de degradación se controla a través de la desorción del herbicida adsorbido de manera más lenta, y es precisamente esta desorción a lo largo del tiempo la que hace que cambie el DT hasta DT_{slow}.

Tabla 5.2. Resumen de las ecuaciones de las Cinéticas utilizadas.

	Ecuación Diferencial	Ecuación Integrada	Tiempos de Disipación
SFO	$\frac{dM}{dt} = -k M$	$M = M_0 e^{-k t}$	$DT_x = \frac{\ln \frac{100}{100-x}}{k}$
SSO	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$	$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt$	$t_{1/2} = \frac{1}{[A]_0 k}$
FOMC	$\frac{dM}{dt} = -\frac{\alpha}{\beta} M \left(\frac{t}{\beta} + 1\right)^{-1}$	$M = \frac{M_0}{\left(\frac{t}{\beta} + 1\right)^\alpha}$	$DT_x = \beta \left[\left(\frac{100}{100-x}\right)^{\left(\frac{1}{\alpha}\right)} - 1 \right]$
DFOP	$\frac{dM}{dt} = -\frac{k_1 g e^{-k_1 t} + k_2 (1-g) e^{-k_2 t}}{g e^{-k_1 t} + (1-g) e^{-k_2 t}} M$	$M = M_0 \left(g e^{-k_1 t} + (1-g) e^{-k_2 t} \right)$	Cálculo Iterativo
HS	$\frac{dM}{dt} = -k_1 M$ for $t \leq t_b$ $\frac{dM}{dt} = -k_2 M$ for $t > t_b$	$M = M_0 e^{-k_1 t}$ for $t \leq t_b$ $M = M_0 e^{-k_1 t_b} e^{-k_2 (t-t_b)}$ for $t > t_b$	$DT_x = \frac{\ln \frac{100}{100-x}}{k_1}$ if $DT_x \leq t_b$ $DT_x = t_b + \frac{\left[\ln \frac{100}{100-x} - k_1 t_b \right]}{k_2}$ if $DT_x > t_b$

5.1.6. OBJETIVOS

- Investigar la disipación en el medio ambiente de algunos de los herbicidas más usados en esta región, mediante 3 ensayos en campo durante los años 2002-2005, en el suelo de una parcela experimental perteneciente al ITACyL, donde se siembra cebada en condiciones de secano.
- Realizar un seguimiento de los niveles de residuos de herbicidas en la capa arable del suelo para conocer si los residuos permanecen de una estación a la siguiente, y por tanto, pueden afectar a los cultivos posteriores.
- Determinar la cinética de la disipación producida por el efecto combinado de todos los procesos que afectan a los herbicidas en el suelo en condiciones reales de campo.
- Realizar un seguimiento de los niveles de residuos de herbicidas en el cultivo de cebada en el momento de la cosecha, para estudiar si estos herbicidas se almacenan en las plantas pudiendo constituir un riesgo para la salud humana y animal.

Hay que tener en cuenta que algunos de los herbicidas utilizados para el ensayo en campo han sido objeto de estudios detallados de volatilización y degradación [33], así como de adsorción-desorción [61], desarrollados con anterioridad por el equipo de trabajo del Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL [30,33,34,61], u otros [62], por lo que se dispone de cierta información sobre su comportamiento y caracterización.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Antes de comenzar los ensayos en campo se tuvieron en cuenta algunos factores interrelacionados que afectaban al estudio e incluían las propiedades físico-químicas del herbicida (Tablas 2.1 y 5.1), su modo de uso, las condiciones medioambientales en que se iban a usar, y las condiciones de análisis de las muestras. En base a estos factores se determinó el tipo de suelo a investigar, el método de aplicación, la profundidad y frecuencia del muestreo, y la cantidad total de suelo muestreado.

Se realizaron tratamientos herbicidas durante 3 años en el suelo de una parcela experimental perteneciente al ITACyL, donde se había sembrado cebada y no se habían realizado tratamientos con fitosanitarios, para realizar un seguimiento de los niveles de residuos de herbicidas en el suelo y el cultivo.

5.2.1. DISEÑO DE LOS ENSAYOS EN CAMPO

5.2.1.1. Parcela

La parcela experimental se escogió debido a su representatividad ya que se encontraba en una zona típica de la meseta castellana, al lado del río Pisuerga, en terreno llano y suelo franco, donde se había sembrado cebada en condiciones de secano en los últimos años. Su localización espacial era: Lat: 41° 41' 54'', Lon: -4° 42' 38'', WGS8.

Durante los tres años en que se desarrollaron los estudios, se sembró en febrero cebada de primavera, de dos carreras o de ciclo corto, produciéndose el nacimiento en marzo.

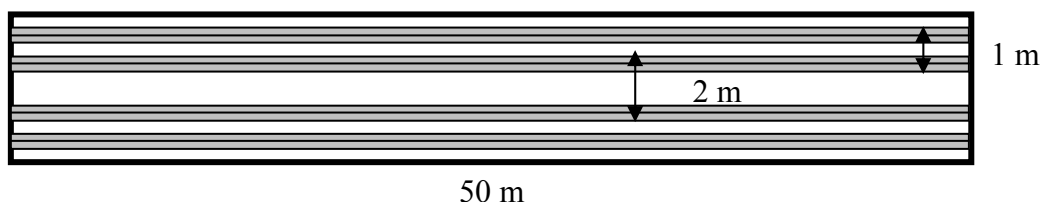


Figura 5.5. Diseño de los ensayos en campo.

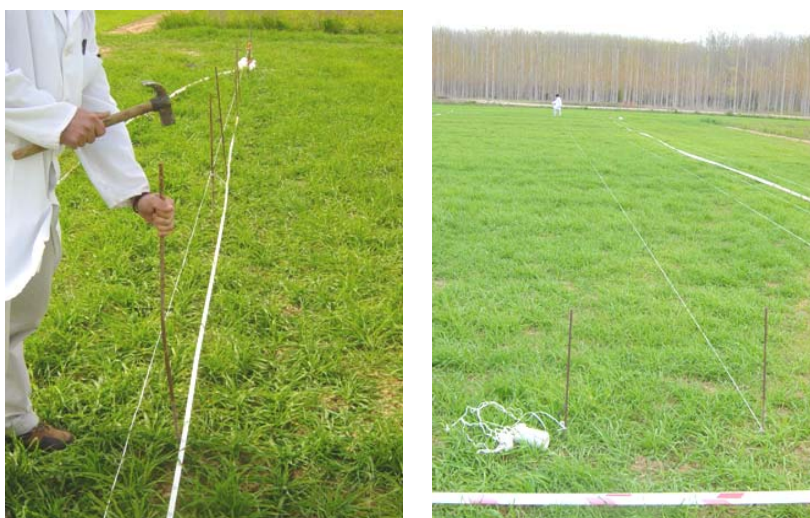


Figura 5.6. Colocación de las estacas que marcan el principio y final de las líneas de tratamiento y de las cuerdas entre ellas.

El terreno se dividió en bandas horizontales, de 50 cm de anchura, aplicándose cada uno de los herbicidas seleccionados a la dosis máxima recomendada por el fabricante. Debido a la variabilidad inherente de los suelos, el estudio en campo se llevó a cabo por duplicado, realizando los tratamientos por separado en cada réplica. Las bandas consecutivas en las que se realizaba el mismo tratamiento se separaban entre sí 1 m, y 2 m con las bandas que se trataban con un producto diferente. Se realizaron los tratamientos a lo largo de 50 m, una extensión lo suficientemente larga como para minimizar el efecto de las variaciones del terreno (Figura 5.5).

Se colocaron estacas marcando el principio y final de los 50 m, y ambas se unieron mediante una cuerda colocada lo más cercana posible al suelo que servía de testigo para realizar el tratamiento y la posterior recogida de las muestras (Figura 5.6). Toda la zona se delimitó para evitar las prácticas agronómicas que habrían alterado las muestras (Figura 5.7).



Figura 5.7. Delimitación de la zona de estudio para evitar que se realizasen prácticas agronómicas durante el ensayo.

Antes de comenzar el ensayo en campo, se tomaron muestras del suelo (en la capa arable, de 0-15 cm) para analizar sus características y usarlas en la validación de la extracción de residuos de herbicidas para asegurar unas correctas recuperaciones y comprobar la ausencia de los herbicidas de estudio antes de su aplicación, datos que se han presentado en el Capítulo 3.



Figura 5.8. Estación meteorológica.

Gracias a una estación meteorológica colocada en la Finca Zamadueñas (Figura 5.8), cercana a la parcela utilizada para los ensayos en campo, se registraron los datos meteorológicos durante el tiempo en que se realizaron los ensayos en campo. Los datos de temperatura media y precipitaciones que proporcionaba se recogen en las Figuras 5.18, 5.19 y 5.33, para los 3 ensayos en campo.

5.2.1.2. Selección de Herbicidas

Los herbicidas se seleccionaron en base a sus propiedades físico-químicas, a la frecuencia de su empleo en esta zona, y a las malas hierbas presentes en el cultivo de cebada [63-66]. Las malas hierbas presentes que prevalecen en esta zona son:

- Malas hierbas de Hoja Ancha (Dicotiledóneas): *Sinapis*, *Poligonum aviculare*, *Chenopodium*, *Fumaria*, *Papaver*, *Verónica*. Suelen salir también *Sonchus*, *Solanum*.
- Malas hierbas de Hoja Estrecha: *Bromus* y *Avena loca*.

Tabla 5.3. Características de los Herbicidas seleccionados para los dos primeros ensayos (2002-2003 y 2003-2004) [65].

Producto (Casa)	Materia activa	Efectos	Aplicación	Dosis	Toxicidad
Buctril (Aventis)	Bromoxinil 24% p/v EC (éster octanoico)	Adventicias de Hoja Ancha	post-emergencia del cultivo y de malas hierbas	1-2 l/ha	XnBCA
Super Suffix TC (BASF)	Flamprop Isopropil 20% p/v EC	Sólo contra especies de Ballueca (Avena loca)	post-emergencia, desde el ahijado hasta el 2 ^{do} nudo del encañado	3 a 3,5 l/ha. Se recomienda 300 l agua/ha en aplicación terrestre	XnAB
Isoproturon 50 (LA)	Isoproturon 50% p/v SC	Hoja Ancha y Estrecha (principalmente Vallico y Cola de Zorra, algo de Ballueca y Vulpia)	pre y post-emergencia del cultivo	Suelos ligeros, 3 l/ha; Medios, 3,5 l/ha y fuertes, 4 l/ha. Diluir en 400 l agua/ha o más.	XnAAA
Stomp Le (BASF)	Pendimetalina 33% p/v EC	Muchas Hoja Ancha y algunas de Estrecha	pre-emergencia o post-emergencia temprana	Suelos ligeros, 4 l/ha; francos, 5 l/ha y pesados 6 l/ha. Diluir en 300 l agua/ha o más	XnACA
Terburex (Aragonesas)	Terbutrina 49% p/v SC	Pocas de Hoja Ancha y bastantes de Hoja estrecha (Bromo)	Pre y postemergencia precoz del cultivo y de las malas hierbas.	0,8 a 2 l/ha. Se aconseja diluir la dosis en 400-600 l agua/ha. No aplicar en suelos muy arenosos.	XiABA
Avadex BW (Monsanto)	Triallato 40% p/v EC	Hoja Estrecha (Avena loca y otras Gramíneas)	Antes de la siembra y pre-emergencia	3 a 3,5 l/ha, aplicar al suelo en pulverización a baja presión incorporando ligeramente	XiAB

Se escogieron herbicidas en formulaciones comerciales de post-emergencia precoz para malas hierbas de hoja ancha y estrecha, para los que se realizó el tratamiento con la planta ya crecida pero en un estado no muy avanzado de su ciclo vital, es decir, antes del encañamiento (Tablas 5.3-5.4).

Tabla 5.4. Características de los Herbicidas seleccionados para el 3^{er} ensayo (2004-2005) [65].

Producto (Casa)	Materia activa	Efectos	Aplicación	Dosis	Toxicidad
Banvel triple (Novartis)	2,4-D 29.6%, (sal amina) MCPA 26.5%, (sal amina) Dicamba 10% (sal amina) p/v SL	Adventicidas de hoja ancha	durante el ahijado del cereal	0,8-1,5 l/ha en 400-500 l de agua	XnBAB
Brioxil supper (Aragonesas)	Ioxinil 7.5%, (éster octanoico) Bromoxinil 7.5% (éster octanoico) MCPA 37.5% (éster isoctílico) p/v EC	Dicotiledóneas	Post-emergencia, aplicar desde el estado de 3-4 hojas hasta principio del encañado	Cebada de invierno 2-3 l/ha, cebada de primavera 1,5-2 l/ha. Diluir en 400-600 l agua	XnBC
Gamo (AgrEvo)	Diclofop metil 24% Fenoxaprop p etil 2% Mefenpir dietil 4% p/v EW	Gramíneas anuales	Post-emergencia de hoja estrecha, desde 2 hojas hasta mediados del ahijamiento	2,5 l/ha	XnAB

p/v, en relación peso/volumen
EC, concentrado emulsionable
SC, suspensión coloidal
SL, concentrado soluble
EW, emulsión de aceite en agua
Toxicidad (Capítulo 1)

Durante el desarrollo de este estudio se prohibió la Terbutrina, en cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento CE 2076/2002, de 20 de noviembre, y comenzó su proceso de retirada. Aún así se consideró interesante utilizarla en los ensayos en campo ya que el plazo límite para la comercialización de existencias se había fijado a 31 de octubre de 2003, y el plazo máximo de utilización, a 31 de diciembre de 2003.

En los dos primeros ensayos se aplicaron herbicidas individuales de familias diferentes. En el 3^{er} ensayo se utilizaron herbicidas de la misma familia, fenoxiácidos e hidroxibenzonitrilos, a excepción del Diclofop, y en formulaciones múltiples, es decir, contenían varias materias activas, para estudiar la diferencia frente a los herbicidas únicos usados en los dos ensayos anteriores. Los fenoxiácidos tenían características muy diferentes a las de los dos primeros ensayos. Se escogieron con la idea de evaluar el destino de productos tan diferentes en la misma parcela.

5.2.2. TRATAMIENTOS

Para realizar adecuadamente los tratamientos, era necesario tener en cuenta el caudal de la boquilla una vez calibrado, la capacidad del tanque de la mochila y el nivel de aplicación del producto [67].

Los productos comerciales seleccionados se usaron en forma de suspensiones acuosas y se aplicaron a las mayores dosis recomendadas, según las etiquetas de los productos y el Vademécum [65], ya que para estudiar los posibles residuos en el suelo y el cultivo, se les exponía a las mayores concentraciones posible de producto, para simular las peores condiciones de uso. De la misma manera, se escogió el menor volumen de dilución de los productos comerciales según las recomendaciones del Vademécum (400 l de agua/ha) [65]. Las dosis usadas fueron las siguientes:

1^{er} y 2^{do} Ensayo: Se trataron 30 m² por cada herbicida ensayado, ya que se contaminaban 2 líneas de 50 m con una boquilla de 30 cm de diámetro. Tomando como referencia la dilución en 400 l agua/ha, se necesitaba diluir el producto en 1,2 l de agua.

- Buctril (Bromoxinil octanoato): 2 l/ha (1ha = 10.000 m²) = 6 ml/30 m²
- Supper suffix TC (Flamprop isopropil): 3,5 l/ha = 10,5 ml/30 m²
- Isoproturon: 3,5 l/ha = 10,5ml/30 m²
- Stomp Le (Pendimetalina): 5 l/ha = 15 ml/30 m²
- Terburex (Terbutrina): 2 l/ha = 6 ml/30 m²
- Avadex BW (Trialato): 3,5 l/ha = 10,5 ml/30 m²

3^{er} ensayo: Se utilizó una boquilla de 50 cm de diámetro en las 2 líneas de 50 m, por lo que se trataron 50 m² por cada herbicida ensayado, y, por tanto, el volumen necesario de agua era mayor, de 2 l de agua.

- Banvel triple (2,4-D, MCPA, Dicamba): 1,5 l/ha = 7,5 ml/50 m²
- Brioxil supper (Bromoxinil octanoato, Ioxinil octanoato, MCPP isooctílico): 2 l/ha = 10 mL/50 m²
- Gamo (Diclofop metil, Mefenpir dietil, Fenoxaprop p etil): 2,5 l/ha = 12,5 ml/50 m²

En principio en todos los casos, se utilizó un poco más de volumen de agua para evitar que la mochila quedara totalmente vacía y perdiera presión.

Para calcular la velocidad del tratamiento, se tenía en cuenta el tiempo que tardaba el aplicador en tratar toda la longitud de la parcela de ensayo. Se ajustó a una velocidad andando de 1 m/s, ya que era una velocidad de paso fácil de controlar. Las estacas colocadas a 0, 10, 20, 30, 40 y 50 m servían de guía a la hora de realizar los tratamientos, ya que se medía con un cronómetro el tiempo que tardaba en pasar el aplicador para ajustar lo más exactamente posible la cantidad de producto aplicado. Se realizaban dos pasadas a lo largo de los 50 m de cada línea, por lo que se tardaba 100 s en tratar cada réplica.

Calibración del Pulverizador

El pulverizador usado para realizar todos los tratamientos era una mochila de accionamiento manual de la marca Matabi.

1^{er} y 2^{do} Ensayo: Se llenó la mochila con 1,2 l de agua, se dio presión y se midió el volumen cada 25 s. La media del caudal cada 100 s fue de 5,7 ml/s. En 200 s (100 s

cada réplica) caían 1140 ml, lo que era similar al 1,2 l de volumen de dilución de los herbicidas que había en la mochila.

3^{er} ensayo: Se llenó la mochila con 2 l de agua, se dio presión y se midió el volumen cada 25 s. La media del caudal cada 100 s fue de 9,3 ml/s. En 200 s caían 1860 ml, que equivalía a los 2 l de volumen de dilución de los herbicidas en la mochila.

Tratamientos

Dentro del plazo para realizar los tratamientos en función del ciclo vital de la planta y de las especificaciones del Vademécum, se escogieron días en los que no llovía y no había mucho viento, para minimizar las pérdidas por volatilización y lixiviación. Las fechas en que se realizaron los tratamientos en los 3 años están recogidas en la Tabla 5.5.



Figuras 5.9 y 5.10. Preparación de las soluciones acuosas de los herbicidas y aplicación de los tratamientos.

En el laboratorio se pesó la cantidad de producto necesaria y se llevó al campo en botes de vidrio topacio de rosca de 50 ml. Se realizaban las diluciones en la mochila, agitando bien antes del tratamiento (Figura 5.9). Éste se realizaba sobre las cuerdas que marcaban las líneas, a unos 30 cm del suelo sobre las plantas de cebada ya nacidas, pero sin encañar (Figura 5.10).

Al finalizar un tratamiento, se enjuagaba bien la mochila dos veces con agua limpia que se desechaba y se procedía a realizar el siguiente. En cada línea se volvía a dar presión a la mochila antes de continuar, para intentar que las réplicas fueran lo más similares posible.

En el 2^{do} ensayo, se repitieron los tratamientos del primero (excepto para el Bromoxinil, repetido en el 3^{er} ensayo) para estudiar como afectaban las distintas condiciones climatológicas a la disipación. Sin embargo, la parcela en la que se realizó el estudio fue la misma para no introducir la variable del terreno.

El 3^{er} tratamiento se realizó más tarde debido a que el mes de abril del año 2004 fue lluvioso y con fuertes vientos, lo que dificultaba la aplicación.

5.2.3. MUESTRAS DE SUELO

La variabilidad del suelo, el tamaño de la parcela, las prácticas agronómicas, la forma de aplicación de los tratamientos y los conocimientos previos de los productos, se usaron para diseñar el protocolo de muestreo.

5.2.3.1. Diseño del Muestreo

Los suelos agrícolas son muy heterogéneos y sus propiedades varían significativamente de un lugar a otro de la parcela, por lo que debe realizarse el análisis sobre una muestra representativa del total de la parcela.

El muestreo se inició el mismo día del tratamiento después de la aplicación, con objeto de medir la concentración inicial de herbicida. Todas las muestras se tomaron a la misma hora (al mediodía) para evitar los picos de concentración producidos por el rocío.



Figuras 5.11, 5.12 y 5.13. Toma-muestras, Cubo y Sonda tipo Edelman usados para la toma de muestras de suelo.

La profundidad del muestreo depende del conocimiento que se tenga de la movilidad y lixiviación del producto, así como de su adsorción al suelo y de su velocidad de degradación. Para que el tratamiento sea efectivo el herbicida debe distribuirse entre los primeros 10 cm del suelo, donde se depositan la mayor parte de las semillas de especies anuales de malas hierbas y los órganos reproductivos de las perennes que germinan ese año.

Según se refleja en la Tabla 5.1, el único herbicida altamente lixiviable era el Dicamba, aunque su lixiviación depende del tipo de suelo [68]. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en lísímetros, el 97% del herbicida aplicado se encontraba en los primeros 20 cm del suelo [69], por lo que se decidió realizar el muestreo en la capa arable (15 cm).

Se tomaron 10 puntos al azar separados entre sí a lo largo de cada línea de 50 m, lo más cerca posible de la cuerda que marcaba por donde se había realizado el tratamiento. Se utilizaba para ello un toma-muestras metálico de forma tronco-cónica de 5 cm de diámetro y 25 cm de profundidad que se introducía en el suelo con un mazo (Figura 5.11). Se unían las muestras simples para formar una compuesta en un cubo (Figura 5.12), se mezclaban bien y se tomaba una muestra representativa antes de guardarla en una bolsa de plástico de cierre hermético, etiquetarla y llevarla al laboratorio. Cuando el

suelo estaba más húmedo se usaba una sonda tipo Edelman con cuidado de que la profundidad de muestreo fuera la misma (Figura 5.13). En los casos en que había cubierta vegetal (restos de cultivo, malas hierbas, etc), se retiraba antes de proceder al muestreo.

Se repetía para la otra línea del tratamiento, y en ningún caso se mezclaban las muestras de las réplicas.

Tabla 5.5. Calendario de Tratamientos y Muestreo de Suelos en los 3 ensayos en campo. Se han sombreado en cada ensayo (indicando **Cb**) los días en que se muestreó también Cebada.

1 ^{er} (2002-2003)			2 ^{do} (2003-2004)			3 ^{er} (2004-2005)		
Nº	Fecha	Nº días	Nº	Fecha	Nº días	Nº	Fecha	Nº días
1	29-abr-02	14:00 h	1	7-abr-03	11:00 h	1	12-may-04	10:30 h
2	29-abr-02	17:00 h	2	7-abr-03	13:00 h	2	12-may-04	13:00 h
3	30-abr-02	1	3	8-abr-03	1	3	13-may-04	1
4	1-may-02	2	4	9-abr-03	2	4	14-may-04	2
5	2-may-02	3	5	10-abr-03	3	5	15-may-04	3
6	3-may-02	4	6	11-abr-03	4	6	17-may-04	5
7	6-may-02	7	7	14-abr-03	7	7	18-may-04	6
8	14-may-02	15	8	21-abr-03	14	8	19-may-04	7
9	17-may-02	18	9	24-abr-03	17	9	20-may-04	8
10	20-may-02	21	10	28-abr-03	21	10	21-may-04	9
11	24-may-02	25	11	29-abr-03	22	11	24-may-04	12
12	27-may-02	28	12	2-may-03	25	12	26-may-04	14
13	31-may-02	32	13	5-may-03	28	13	27-may-04	15
14	3-jun-02	35	14	14-may-03	37	14	28-may-04	16
15	7-jun-02	39	15	20-may-03	43	15	31-may-04	19
16	10-jun-02	42	16	9-jun-03	63	16	1-jun-04	20
17	14-jun-02	46	17-Cb	1-jul-03	85	17	3-jun-04	22
18	18-jun-02	50	18	29-sep-03	176	18	4-jun-04	23
19	21-jun-02	53	19	3-nov-03	211	19	7-jun-04	26
20-Cb	24-jun-02	56	20	6-feb-04	306	20	9-jun-04	28
21	1-jul-02	63	21	23-mar-04	352	21	14-jun-04	33
22	24-jul-02	86	22	31-may-04	420	22	16-jun-04	35
23	1-ago-02	94	23	30-jul-04	480	23	23-jun-04	42
24	8-ago-02	101				18	25-jun-04	44
25	14-ago-02	107				25-Cb	30-jun-04	49
26	27-ago-02	120				26	29-jul-04	79
27	5-sep-02	129				27	28-ago-04	109
28	8-oct-02	162				28	23-nov-04	204
29	10-ene-03	256				29	15-feb-05	288
30	9-feb-03	286						
31	28-mar-03	333						
32	29-abr-03	365						
33	6-may-03	372						

Según diversas recomendaciones, los datos que se deben aportar, para los estudios a corto plazo, se realizan a las 24 horas, 2 días y 4 días después de la aplicación, mientras que a largo plazo se efectúan a los 7 días, 28 días, 50 días y 100 días [70]. De la misma manera, la Directiva 91/414/EEC indica que los estudios de disipación en suelo se realizan hasta que el 90% de la cantidad aplicada se haya disipado, con una duración máxima de 24 meses.

Después del tratamiento se tomaron muestras a la hora y media, a las cuatro-cinco horas, y posteriormente a intervalos de tiempo crecientes. La primera semana se tomaron muestras diariamente, pasando a continuación a realizar tomas cada cuatro días, 15 días y un mes a medida que pasaba el tiempo. Algunos días no pudo realizarse el muestreo ya que no se podían tomar muestras inmediatamente después de una lluvia. En todo caso se tomaron en suficiente número a lo largo del tiempo para que la disipación fuera representativa.

El muestreo durante el 2^{do} ensayo fue diferente respecto del primero. Se tomaron las muestras más espaciadas, una vez al mes y durante más tiempo (hasta 480 días en vez de los 372 del primer ensayo). En el 3^{er} ensayo, se muestreó más al principio y durante menos tiempo, ya que los herbicidas aplicados se degradaban más rápidamente.

5.2.3.2. Pretratamiento y Extracción de Residuos en Suelo

Las muestras de suelo se trataron de la manera ya descrita en el Apartado 3.2.4. Se almacenaron en oscuridad a -20°C hasta su análisis (se controlaba diariamente la temperatura del arcón congelador con termómetros de máxima y mínima). Esto impedía que actuasen los enzimas responsables de la degradación de los herbicidas y que los residuos se unieran fuertemente a la matriz.

Extracción de Muestras de Suelo

Se estableció como criterio de calidad, la verificación previa a cada análisis de muestras del cumplimiento de los porcentajes de recuperación de blancos de suelo fortificados, el mantenimiento de los parámetros de la curva de calibrado, y la ausencia de contaminación, a través del análisis de blancos de matriz.

Se utilizó la incertidumbre máxima calculada a partir de la validación del procedimiento de extracción de las muestras de suelo (Tabla 3.15), para conocer la incertidumbre de cada valor determinado en los estudios de campo.

La cantidad del suelo inicialmente extraída era de 5 g, ya que contenía valores altos de residuos de herbicidas, y se fue incrementando hasta 15 g al final de los ensayos, cuando las concentraciones de los residuos de herbicidas ya eran muy pequeñas.

Como se había demostrado la existencia de efecto matriz en la validación del método de extracción, todos los herbicidas analizados se cuantificaron con calibrados en matriz. Las respuestas usadas para cuantificar residuos se diluían hasta el rango lineal del detector si contenían un nivel alto de residuos, y la concentración de la matriz en los extractos de los calibrados en matriz también se ajustaba.

Ya se ha comentado que en el caso de aquellos herbicidas aplicados en forma de éster, ya fuera octanoico para el Bromoxinil e Ioxinil, isooctílico en el caso del MCPP o metil para el Diclofop, se hidrolizaban rápidamente en contacto con el suelo, por lo que solían estar en forma de sus correspondientes ácidos y fenoles.

Se analizaban los extractos en dos alícuotas, una derivatizada y otra sin derivatizar, según lo detallado en el Capítulo 2. Se comprobaba que los ésteres originales de los herbicidas aplicados se hidrolizaban rápidamente tras su aplicación en el suelo, ya que no se detectaban en ninguna de las dos alícuotas.

De la misma manera, las sales aminas de 2,4-D, Dicamba y MCPA aplicadas en el 3^{er} ensayo, se hidrolizaban rápidamente a sus correspondientes ácidos por lo que se analizaban en forma de sus ésteres metílicos con TMSH.

5.2.3.3. Cálculo de la Cantidad Inicial de Herbicida en el Suelo

Las concentraciones iniciales se calcularon teniendo en cuenta la cantidad de herbicida añadida al suelo, la fracción del mismo que interceptaba el cultivo no dejando que llegase al suelo, la profundidad a la que penetraba en el suelo y la densidad de éste en peso seco. Para ello se utilizaba la siguiente fórmula:

$$PEC_{s,0} = A \times (1 - f_{int}) / (100 \times depth \times bd)$$

Donde $PEC_{s,0}$, era la cantidad inicial de herbicida que había en el suelo, A era la dosis (ml/ha ó g/ha), f_{int} la fracción interceptada por el cultivo, $depth$ se refería a la profundidad a la que el tratamiento penetraba en el suelo (cm), y bd era la densidad del suelo en peso seco (g/cm^3) [52].

Se asumía que la densidad del suelo era de $1,5 g/cm^3$, a una profundidad de 5 cm cuando la aplicación se hacía sobre la superficie del suelo. Como norma general, se consideraba que las plantas no interceptaban los residuos para las aplicaciones en pre-emergencia, mientras que cuando el cultivo ya estaba nacido, se asumía que únicamente el 50% de lo aplicado alcanzaba la superficie del suelo, valor que se utilizó en estos ensayos ya que los tratamientos se realizaron en post-emergencia [52].

Tabla 5.6. Cálculo de la cantidad inicial de herbicida aplicado en el suelo y LQ necesario, según las recomendaciones de FOCUS [52]. Los LC optimizados subrayados son mayores que los LC necesarios.

1 ^{er} -2 ^{do} ENSAYO		%	Vademécum (l/ha)	ml en mochila	densidad (g/ml)	PEC _{s,0} (ng/g)	LC necesario	LC optimiz
Buctril	Bromoxinil oct.	24	2	6	1,0499	336,0	16,8	8,6
Super Suffix TC	Flamprop isop.	20	3,5	10,5	0,96025	448,1	22,4	8,3
Arelon 50	Isoproturon	50	4	12	1,11627	1488,4	74,4	11,7
Stomp Le	Pendimetalina	33	6	18	1,00065	1320,9	66,0	15,5
Terburex	Terbutrina	49	2	6	1,06467	695,6	34,8	12,6
Avadex BW	Trialato	40	3,5	10,5	1,0443	974,7	48,7	16,5
3 ^{er} ENSAYO		%						
Banvel triple	2,4-D sal amina	29,6	1,5	7,5	1,2291	363,8	18,2	12,4
	MCPA sal amina	26,5				325,7	16,3	12,2
	Dicamba sal amina	10				122,9	6,1	<u>7,3</u>
Brioxil supper	Ioxinil octanoico	7,5	3	15	1,1138	167,1	8,4	<u>13,8</u>
	Bromoxinil oct.	7,5				167,1	8,4	<u>8,6</u>
	MCPP isooctílico	37,5				835,4	41,8	13,0
Gamo	Diclofop metil	24	2,5	12,5	1,0954	438,2	21,9	12,8
	Fenoxaprop p etil	2				37,5	1,8	<u>14,4</u>
	Mefenpir dietil	4				73,0	3,7	<u>18,1</u>

Las agencias legisladoras normalmente exigen que el LC del método analítico optimizado alcance valores de DT₉₀, por lo que los métodos analíticos desarrollados tienen que ser capaces de determinar residuos equivalentes al menos del 5% de la cantidad inicialmente aplicada (valor LC necesario en la Tabla 5.6). En el caso de los ésteres y las sales, se comparó con el LC del ácido derivatizado correspondiente.

Se comprobó que, en general, el método desarrollado para la extracción de residuos en suelos en el Capítulo 3 era adecuado para las muestras de los ensayos en campo. En el

caso de los productos comerciales múltiples aplicados en el 3^{er} ensayo, los LC de algunos herbicidas obtenidos con el método optimizado eran ligeramente inferiores a los necesarios debido a que ciertas materias activas estaban presentes en porcentajes muy bajos en las mezclas comerciales.

5.2.3.4. Cálculo de las Cinéticas de Disipación y DT₅₀/DT₉₀

Una vez extraídas las muestras de suelo a lo largo del tiempo, se estimó su cinética de disipación. Para ello se utilizó el programa *ModelMaker* v 4.0 (*FamilyGenetix* Ltd. Beaconsfield, Buckinghamshire, Reino Unido. 2000) (Figura 5.14).

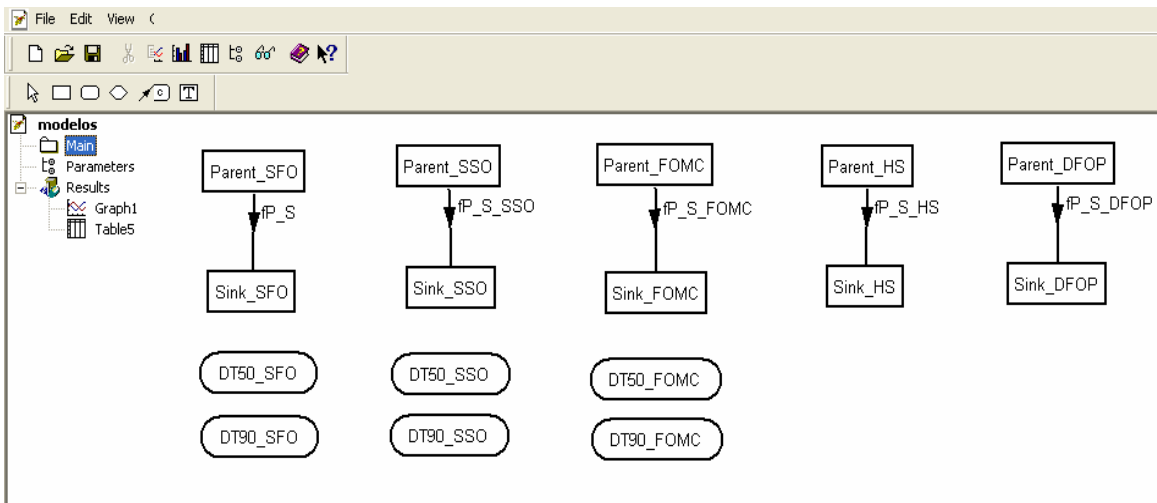


Figura 5.14. Programa *ModelMaker* con las diferentes cinéticas usadas.

El programa iniciaba el cálculo a partir de los valores introducidos por el modelador y los iba cambiando constantemente hasta que encontraba la combinación de valores de los parámetros que proporcionaba el mejor ajuste, definido en forma de expresión matemática, en este caso, como la suma de cuadrados de los residuales.

Para la obtención de los parámetros de los modelos se realizaba un ajuste que minimizaba la suma de cuadrados de los residuales entre los valores observados y los obtenidos con el modelo mediante el modelo de mínimos cuadrados no lineal de Levenberg-Marquardt, mediante cálculo iterativo [71]. En todos los ajustes realizados se obtenía la convergencia con el nivel de tolerancia deseado (0,000001).

Los valores iniciales de los parámetros eran importantes ya que influían en los resultados estimados. Por tanto, al menos se usaban dos valores iniciales diferentes para comprobar que el valor final que proporcionaba el modelo era el mismo. Si no, se corría el error de pararse en un mínimo local en lugar de hacerlo en el mínimo global.

En general como valor inicial de concentración se usaba el analítico y el hallado con la $PEC_{s,0}$, y como valor de constante de degradación en la cinética de primer orden, se usaba el $\ln(2)$ dividido por el tiempo al que la mitad de la concentración inicial había desaparecido.

Para el cálculo de los parámetros de las cinéticas, se consideró más adecuado estimar la concentración inicial a partir de los modelos como un parámetro más (M_0), que fijarla en el valor encontrado analíticamente en el primer día de tratamiento, ya que éste era más incierto en los estudios de campo que en los de laboratorio.

Una vez obtenidos los valores de los parámetros con el programa *ModelMaker*, se afinaban mediante el cálculo iterativo con la herramienta *Solver del programa Excel* (Microsoft, 2000).

Comprobación del Ajuste de las Cinéticas

La validez del modelo escogido se comprobaba a través de un test de “fallo del ajuste” que detectaba si la desviación de los puntos con respecto a los valores predichos por el polinomio calculado a partir de los datos obtenidos en el diseño era debida sólo a errores aleatorios (error experimental) o a un error sistemático (modelo no correcto).

Se utilizaron los siguientes parámetros y pruebas estadísticas para la comprobación de la bondad del ajuste:

1. Ajuste visual: gráfico de los valores observados y la curva de los predichos con el modelo, frente al tiempo.
2. Gráfico de residuales frente al tiempo: útil para revelar tendencias en los modelos que sobrestiman o subestiman los datos, indicando un ajuste inadecuado o el uso de un modelo erróneo. Si el ajuste era perfecto, los residuales eran nulos. No debían presentar una tendencia, es decir, debían ser igualmente positivos y negativos a través del tiempo.
3. Gráfico de los valores predichos frente a los observados: Idealmente se tenía que obtener una línea de pendiente estadísticamente igual a 1 y ordenada estadísticamente igual a cero, lo que demostraba que no se habían introducido errores sistemáticos. Podía usarse el coeficiente de determinación pero en combinación con los valores anteriores, ya que por si solo no era indicativo del ajuste. Todos los puntos debían estar repartidos aleatoriamente a lo largo de la línea o caer idealmente sobre ella.
4. Suma de cuadrados de los residuales (RSS): servía para comparar los modelos entre sí de tal forma que cuanto menor era su valor, mejor era el ajuste [72].
5. Test de Chi cuadrado (χ^2): prueba de significación que indicaba si el modelo era adecuado, demostrando que las diferencias entre los valores observados y calculados no se debían al azar. Este test era muy sensible a las réplicas por lo que se usaba el valor de las medias en el análisis estadístico, de manera que impedía que el test se enfocase hacia la desviación de las réplicas en lugar de hacia la falta de ajuste del modelo. Se calculaba mediante la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(C - O)^2}{(err / 100 \times \bar{O})^2}$$

donde C era el valor calculado, O el valor observado, y err el porcentaje del error medido. El valor que proporcionaba la ecuación tenía que ser menor que el tabulado para una probabilidad del 5% (función (CHIINV(a,m) en Excel).

En lugar de este cálculo suele usarse el error de chi, calculado con la fórmula expuesta debajo, que era el valor de chi en el modelo para que pasase el test a un 95% de confianza. El modelo con el menor error era el que proporcionaba el mejor ajuste.

$$\text{err} = 100 \cdot \sqrt{\frac{1}{X_{\text{liberada}}} \cdot \sum \frac{(C-O)^2}{O^2}}$$

6. Test de t: usado para estudiar la confianza en los valores de los parámetros optimizados que proporcionaba el modelo. Si el valor no era significativamente diferente de cero a un nivel dado, implicaba que, o bien el parámetro era muy incierto debido a la variabilidad de los datos, o bien el modelo no era adecuado para ajustarlos. Este test no era aplicable a todos los parámetros de los modelos, sino únicamente a las constantes de disipación [52]. Su fórmula era la siguiente, donde \hat{a}_i era el parámetro y σ_i su error estándar:

$$t = \frac{\hat{a}_i}{\sigma_i}$$

5.2.4. MUESTRAS DE CEBADA

5.2.4.1. Diseño del Muestreo

Cuando se aplican los productos en una parcela cultivada, es necesario muestrear el material vegetal para llevar a cabo un análisis de residuos.

Las muestras se tomaron de acuerdo con la Directiva 2002/63/EC de la Comisión, de 11 de Julio, por la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal, y de acuerdo con el RD 290/2003, de 7 de Marzo, que la transpone.



Figuras 5.15 y 5.16. Recogida manual de las muestras de cebada y colocación en bolsas de papel o bandejas para su traslado al laboratorio.

Se recogieron las muestras de cebada de forma manual en varios sitios a lo largo de las líneas una sola vez antes de la cosecha, intentando arrancar las plantas enteras con las que se formaba una muestra compuesta de más o menos 1 kg, según las recomendaciones de la FAO [45]. Se depositaban en bolsas de papel o bandejas (Figuras 5.15 y 5.16). En todo el proceso se tenía especial cuidado en no contaminar las muestras entre sí, ni en muestrear cerca del borde.

Se tomaron muestras de cebada del mismo campo para usarlas como blancos de matriz, en una zona donde no se habían realizado tratamientos con herbicidas y que no estaba expuesta a los tratamientos realizados.

5.2.4.2. Pretratamiento y Extracción de Residuos en Cebada

Las muestras de cebada se trataron de la manera ya descrita en el Apartado 4.2.3. Se almacenaron en oscuridad a -20°C hasta su análisis (se controlaba diariamente la temperatura del arcón congelador con termómetros de máxima y mínima). Esto impedía que actuaran los enzimas responsables de la degradación de los herbicidas y que los residuos se unieran fuertemente a la matriz.

Se estableció como criterio de calidad, la verificación previa a cada análisis de muestras del cumplimiento de los porcentajes de recuperación de blancos de grano y paja fortificados, el mantenimiento de los parámetros de la curva de calibrado, y la ausencia de contaminación, a través del análisis de blancos de matriz.

No fue necesario el cálculo de las cinéticas de disipación en la cebada porque la aplicación de los herbicidas se realizó principalmente sobre el suelo, y únicamente se muestreó el cereal puntualmente antes de la cosecha para estudiar la presencia de residuos perjudiciales.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en los ensayos de persistencia en campo, que principalmente se centraron en el estudio de las cinéticas de disipación para conocer la forma en que evolucionaban los herbicidas en el suelo. Estos datos obtenidos experimentalmente se compararon con datos realizados en otros estudios similares, teniendo en cuenta el tipo de suelo, el herbicida y las condiciones climáticas en cada uno de ellos.

Por último se estudiaba la presencia de residuos en muestras de cebada tomadas antes de cosechar, para conocer si estos herbicidas se almacenaban en las plantas pudiendo constituir un riesgo para la salud humana y animal.

5.3.1. CINÉTICAS DE DISIPACIÓN Y DT₅₀-DT₉₀ EN SUELO

Se presenta a continuación una tabla resumen (Tabla 5.7) con los principales parámetros proporcionados por el modelo cinético que mejor ajusta los datos para cada uno de los herbicidas ensayados.

Las concentraciones iniciales no se fijaron como la analítica medida en el primer día del tratamiento, sino que se calculaba de manera iterativa como un parámetro más de los modelos de cinéticas (Tabla 5.2), ya que se había comprobado que mejoraba el ajuste.

Se calculó el balance de masas (señalado como % en la Tabla 5.7), con el parámetro Mo (concentración inicial) que proporcionaba la cinética que mejor ajustaba los datos, respecto de la cantidad aplicada, calculada en el apartado 5.2.3.3 (PEC_{s,0} en la Tabla 5.6). Hay que tener en cuenta que estos valores son estimaciones ya que el primero es un valor proporcionado por el modelo, y el segundo es un valor calculado de manera aproximada ya que no se puede saber a ciencia cierta lo que llegaba exactamente al suelo.

Tabla 5.7. Resumen del Ajuste de las Cinéticas para todos los herbicidas estudiados en los 3 ensayos en campo.

Herbicida	PEC _{s,0} (ng/g)	Persistencia (días)		Cinética		Mo (ng/g, Cinética)				DT ₅₀ (días)		DT ₉₀ (días)	
		1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	%	2 ^{do}	%	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}
Isoproturon	1488	286	306	HS	HS	916	62	1155	78	25,8	8,7	46,3	47,2
1 ^{er} - Trialato	975	372	480	HS	DFOP	580	60	954	98	3,4	0,4	22,6	17,2
2 ^{do} - Terbutrina	696	286	306	HS	HS	743	107	741	107	16,1	9,1	61,4	55,9
Pendimetalina	1321	333	352	DFOP	DFOP	1269	96	1106	84	0,3	3,7	56,5	49,5
Flamprop	448	333	352	HS	HS	467	104	511	114	39,4	28,8	155,1	128,9
Bromoxinil	336	63		DFOP		226	67			2,5		12,3	
	Mo	3 ^{er}		3 ^{er}		3 ^{er}	%			3 ^{er}		3 ^{er}	
Bromoxinil	167	49		DFOP		134	80			3,0		29,7	
Ioxinil	167	79		HS		127	76			4,9		31,5	
3 ^{er} MCPP	835	109		HS		730	87			4,2		13,8	
MCPA	326	79		HS		347	106			3,7		25,7	
2,4-D	364	79		DFOP		386	106			3,4		47,1	
Dicamba	123	49		HS		182	148			4,6		21,2	
Diclofop	438	288		HS		302	69			16,9		41,0	

No se pudieron estudiar las cinéticas de disipación del Fenoxaprop p etil y el Mefenpir dietil porque su proporción en el producto comercial era muy baja y solamente se detectaron en los primeros días del ensayo, obteniéndose muy pocos puntos para un ajuste adecuado de los modelos.

Cálculo de las Cinéticas

Para los cálculos de las cinéticas, se usaron todos los datos de las réplicas individualmente, pero para el ajuste de la curva y los tests estadísticos se utilizaron las medias. En general los valores de las réplicas no fueron muy diferentes entre si, a excepción de algunos herbicidas de los ensayados, como el Bromoxinil en el 3^{er} ensayo.

Los valores de las concentraciones se ajustaron sin transformarlos matemáticamente, ya que en los estudios en campo la disipación de los herbicidas estaba influida por un gran número de factores medioambientales que variaban mucho a pequeña escala, y estas transformaciones matemáticas daban pesos estadísticos diferentes a los datos experimentales, lo que podía conducir a una mala estimación de la cinética.

Al primer dato obtenido inferior al LD del herbicida en el suelo, se le daba el valor de la mitad del LD [52]. Los siguientes datos menores que el LD se omitían del cálculo.

Se ajustaron los datos para todos los modelos de cinéticas expuestos en la introducción, excepto para los modelos con periodo de latencia ya que se vio al representar los datos que ninguno de los herbicidas estudiados seguía esa tendencia. De hecho, las constantes de la cinética biexponencial o DFOP, no tomaron nunca los valores de $K_1 > 0$ y $K_2 < 0$, características de esta evolución de tipo sigmoide [60].

Se observó que las cinéticas de orden 1 y 2 no ajustaban bien los datos, ya que, en general, la primera ignoraba los residuos que permanecían en el suelo, mientras que la segunda los magnificaba. La correcta estimación de estos residuos era muy importante ya que determinaba el posible riesgo medioambiental, y resultaron ser las cinéticas bifásicas las que los predecían mejor. El comportamiento bifásico es típico de los ensayos en campo debido a que la fracción de herbicida disponible disminuye con el tiempo al hacerse la adsorción y los procesos de difusión más lentos, lo que también hace que disminuya su degradación [56].

A la vista de la representación de los datos frente al tiempo se deducía que los herbicidas estudiados sufrían primero un periodo de disipación, producido por una degradación rápida llevada a cabo por procesos fisico-químicos (fotólisis, principalmente), seguida por un periodo de persistencia, en el que la degradación era más lenta ya que estaba producida por procesos biológicos, principalmente de degradación microbiana. Este comportamiento descrito mediante modelos bifásicos, considera que el suelo está formado por dos compartimentos diferentes, uno de degradación rápida y otro más lenta, cada uno afectado por una cinética de orden 1, en los que, o bien el herbicida se divide una vez aplicado, como en el modelo DFOP, o bien el herbicida se transfiere de uno a otro a lo largo del tiempo, como en el modelo HS.

Comprobación del Ajuste de las Cinéticas

En una primera aproximación, se comprobaba visualmente el ajuste de los valores observados con el modelo cinético, así como la distribución aleatoria de los residuales.

Los parámetros estadísticos determinados para evaluar la eficiencia de las cinéticas a la hora de predecir el comportamiento de los datos, se indican para cada herbicida en forma de cuadro. Se presentan como tachados aquellos parámetros que no cumplen las

siguientes condiciones:

- Test de t: Si la probabilidad es menor de 0,05, se considera que el parámetro es significativamente diferente de cero. En los casos en que está entre 0,05 y 0,1 se considera aceptable. Los niveles de significación mayores del 10% (0,1) no se consideran aceptables.
- La ordenada en el origen y la pendiente de la recta que representa los valores calculados frente a los observados, deben incluir el cero y el uno, respectivamente.
- El error de χ^2 , al 95% de confianza, es menor del 20%. Éste es un criterio aceptable aunque no es fijo ya que los ensayos en campo están sujetos a más errores que los de laboratorio.

En general para todos los herbicidas del estudio, los tests estadísticos de bondad de ajuste mostraron una mayor eficiencia de simulación de la cinética DFOP o HS, frente a las otras 3 (SFO, SSO, FOMC), ya que presentaron una distribución aleatoria de residuales y de los puntos a lo largo de la recta de los valores calculados frente a los observados, un valor de pendiente más cercano a 1, un intercepto que incluía al cero, un valor del error de chi inferior al 20%, y un menor valor de suma del cuadrado de los residuales (RSS).

Cuando los parámetros α y β del modelo FOMC eran muy grandes, esta cinética se aproximaba mucho a la de primer orden, como se observó para el Isoproturon y el Flamprop en el 1^{er} ensayo, así como para el Diclofop en el tercero.

DT₅₀-DT₉₀ y Persistencia

Los valores de DT₅₀ y DT₉₀ hallados fueron, en general, inferiores a los publicados (Tabla 5.1), debido a que la disipación era siempre mayor en el campo, ya que había más posibilidades para la volatilización, la lixiviación, la fotólisis y el envejecimiento que en los estudios en laboratorio. Sin embargo, la persistencia de algunos herbicidas era elevada, sobre todo para los herbicidas neutros, debido probablemente a las condiciones climáticas en que se había llevado a cabo el ensayo y al tipo de suelo característico de esta zona.

El clima de Castilla y León, de tipo Semiárido Continental [73], se caracteriza por poseer una acusada estacionalidad. El carácter frío es un rasgo general debido a la elevada altitud, lo que genera inviernos largos y fríos, en los que el suelo se congela desde noviembre hasta abril, que contrastan a su vez con veranos cortos y calurosos. Las precipitaciones resultan más bien escasas, con medias anuales que oscilan entre 400 y 600 mm [74].

El suelo utilizado para los ensayos, característico de las estepas cerealistas, contenía escaso contenido en materia orgánica (0,69%), era de textura franca, con un alto contenido en arena (46%), el 17% de arcilla, pH básico (8,5), y humedad escasa (Capacidad de Campo – 0,143, Punto de Marchitez – 0,079). Este tipo de suelos con bajo contenido en arcilla y materia orgánica, tenían poca afinidad por los herbicidas, debido a que la ausencia de coloides del suelo hacía que se adsorbieran poco, con el consiguiente incremento de las pérdidas por lixiviación y volatilización [75].

La materia orgánica del suelo era el factor más importante en la retención de los herbicidas neutros [16], y los herbicidas básicos débiles, como la Terbutrina al pH básico del suelo del ensayo [76]. Análogamente, para los herbicidas de carácter ácido, como los Fenoxiácidos, predominaba la forma iónica del herbicida a este pH y se adsorbían sólo de forma moderada en la materia orgánica, siendo repelidos por las

arcillas. Por tanto, se deducía que la retención era mínima para todos los herbicidas de los estudios en el suelo de la parcela, ya que su contenido en materia orgánica, el coloide sobre el que se adsorbían los herbicidas al pH del suelo, era muy bajo. Una baja retención implicaba una mayor degradación, al poder encontrarse los herbicidas en la disolución del suelo, más aptos para ser degradados. Sin embargo, las condiciones climáticas de las estepas cerealistas, la baja humedad y las temperaturas frías en invierno, no favorecían el desarrollo de los microorganismos, y aumentaban la persistencia. El hecho de realizar los tratamientos en un suelo con baja humedad, hacía que se produjese una mayor adsorción inicial de los herbicidas ya que no había moléculas de agua que compitiesen por los sitios de adsorción [19], lo que podría haber contribuido a incrementar la persistencia.

En un primer acercamiento, teniendo en cuenta el uso agronómico de las tierras de la región, el clima de esta zona, y las características de los herbicidas aplicados, se podía pensar que las principales vías de disipación de éstos podrían ser la volatilización, para herbicidas con valores altos de presión de vapor, como el Trialato, la Pendimetalina y los aplicados en forma de ésteres, o la lixiviación para herbicidas con alto índice GUS, como el Dicamba. De la misma forma, se esperaba que algunos fueran más persistentes, como la Terbutrina, el Diclofop, el Trialato o la Pendimetalina, ya que los tiempos medios de disipación encontrados en la bibliografía eran más elevados que para el resto (Tabla 5.1).

La gran debilidad de los ensayos en campo es que el perfil de disipación observado del herbicida y su transporte es el resultado de muchos parámetros altamente variables, de tal manera que estudios similares llevados a cabo en diferentes sitios, o en el mismo sitio en diferentes años, pueden ser altamente variables [38], análogamente a lo observado para ciertos herbicidas ensayados.

5.3.1.1. 1^{er} Ensayo: 2002-2003 y 2^{do} Ensayo: 2003-2004

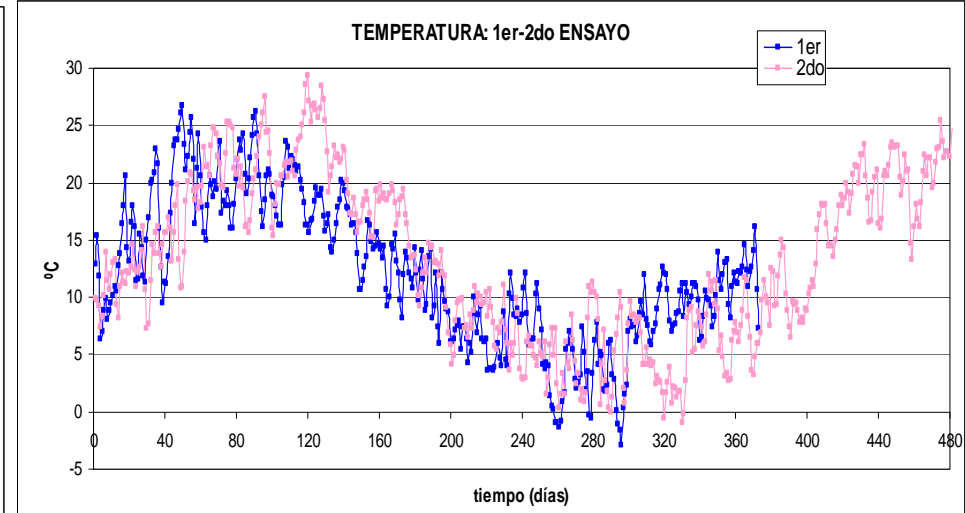
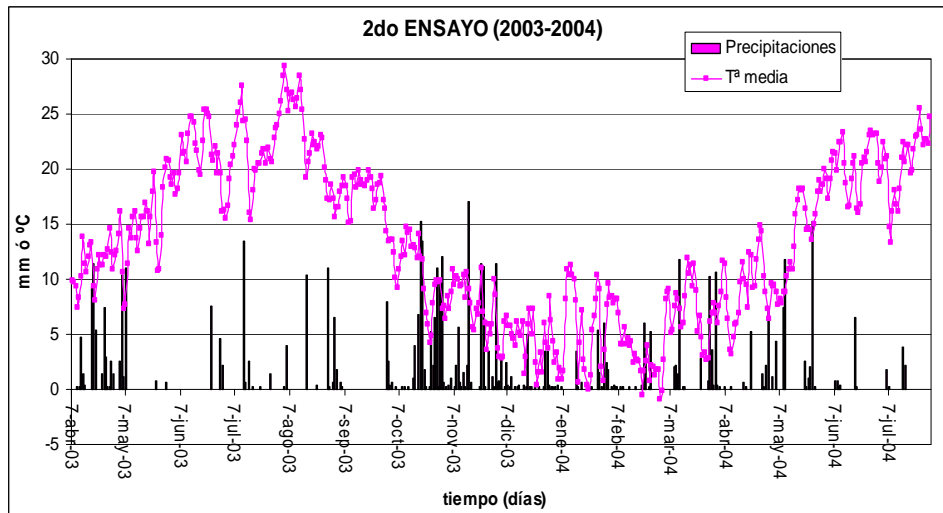
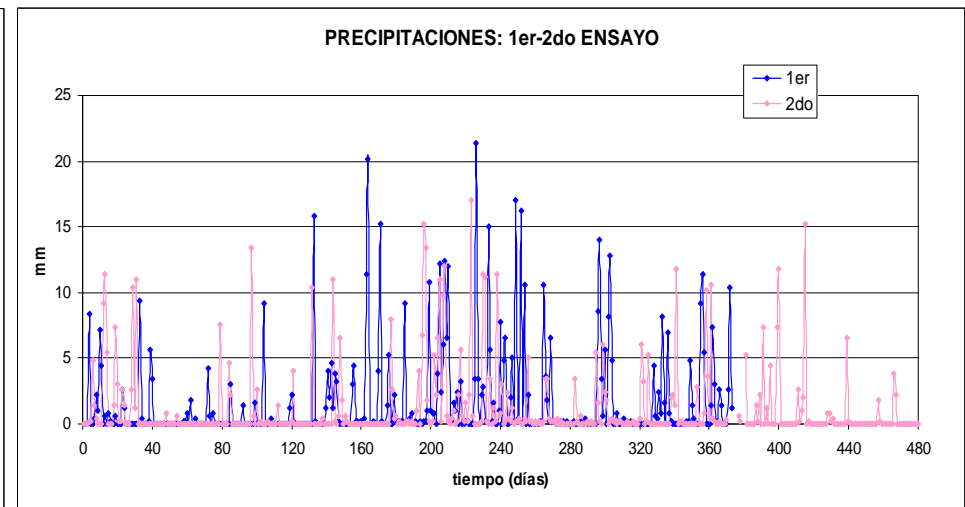
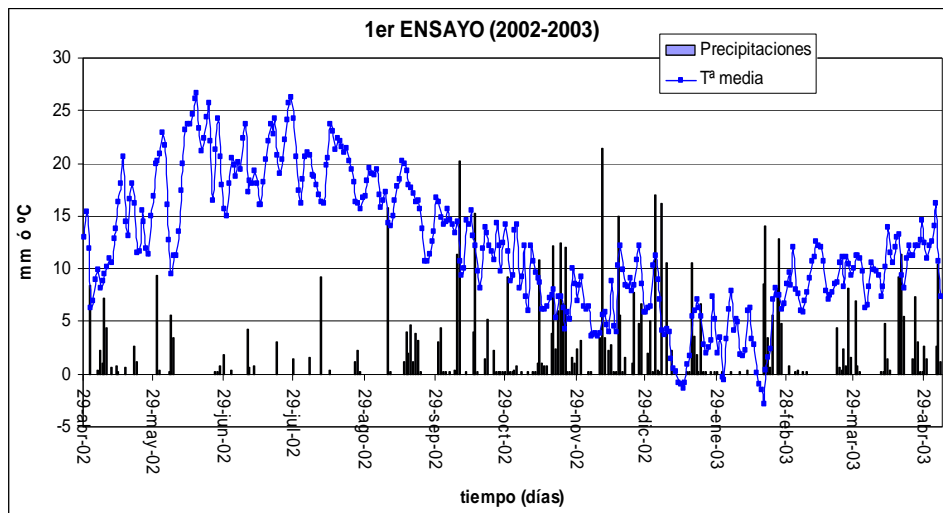
Se presentan los resultados de ambos ensayos de manera conjunta, ya que se usaron los mismos herbicidas en la misma parcela a las mismas dosis (excepto para el Bromoxinil, que se repitió en el 3^{er} ensayo). Únicamente cambiaban las condiciones climatológicas entre los ensayos (Figuras 5.19 y 5.20), única variable que se introdujo con la intención de estudiar su efecto en la disipación de los herbicidas aplicados.

El muestreo durante el 2^{do} ensayo fue más largo que el del 1^{er} (hasta 480 días, en lugar de 372), para estudiar si había residuos que permaneciesen más tiempo, como se demostró para el Trialato, el herbicida más persistente de los estudiados. A su vez, se tomaron las muestras más espaciadas a partir del primer mes, ya que en los resultados del 1^{er} ensayo se había visto que no era necesario tomar tantos puntos para estimar adecuadamente la cinética, hecho que se comprobó porque en ambos ensayos el mejor ajuste lo proporcionaba el mismo modelo, excepto para el Trialato, ya que DFOP predecía mejor la concentración inicial en el 2^{do} ensayo.

Los años en que se produjeron los ensayos fueron de escasas precipitaciones, con una media de 500 mm. Los tratamientos se produjeron en abril, y los meses siguientes fueron calurosos y con escasas lluvias, lo que provocó la rápida disipación de todos los herbicidas, debido principalmente a procesos influidos por la temperatura, como la fotólisis o la volatilización. Sin embargo, aquellos herbicidas que eran persistentes, mantuvieron cantidades residuales durante mucho más tiempo debido a que, en las condiciones de este suelo (baja humedad y escasa materia orgánica) no se favorecían los procesos de degradación microbiológicos, muy importantes en la disipación lenta de los

herbicidas, lo que explicaba la elevada persistencia del Trialato, que permaneció después de 480 días y el elevado valor de DT_{90} para el Flamprop (alrededor de 150 días).

Se esperaba que el efecto de la mayor temperatura y humedad hiciera disminuir los tiempos medios de disipación y, por tanto, la persistencia [34]. Sin embargo, como se deduce de las Figuras 5.19 y 5.20, no se registraron unas condiciones climatológicas muy diferentes entre ambos ensayos, apreciándose una temperatura media ligeramente inferior y mayores precipitaciones en el primer mes del 2^{do} ensayo respecto del 1^{er}, debido a que éste se llevó a cabo casi un mes después (finales de abril). De hecho, el Trialato, la Pendimetalina, y el Flamprop, mostraron el mismo patrón de degradación durante los dos ensayos. El Isoproturon y la Terbutrina, se degradaron más rápidamente en el 2^{do} ensayo, efecto que puede ser debido a las mayores precipitaciones durante el primer mes después de realizar el tratamiento.



Figuras 5.17, 5.18. Temperaturas medias y Precipitaciones registradas durante los dos primeros ensayos en campo.

Figuras 5.19 y 5.20. Comparación de Temperaturas medias y Precipitaciones entre los dos primeros ensayos en campo.

A continuación se presentan en forma de tabla, para cada uno de los herbicidas estudiados, los parámetros optimizados con cada modelo cinético y sus errores estándar, así como los parámetros que definen la bondad del ajuste de cada uno, tachando aquellos que no cumplen los criterios establecidos, y sombreando en gris los parámetros del modelo más idóneo. DT_x son los puntos de disipación, DT_{50f} - DT_{90f} se refieren al compartimento de disipación rápida en HS, y DT_{50s} - DT_{90s} , al de disipación lenta. En el caso de ser HS la cinética más adecuada, se han sombreado los valores de DT_x que aplican en cada caso, en función del valor del tiempo de ruptura (t_b). r^2 es el coeficiente de determinación, a la ordenada en el origen, b la pendiente de la recta que surge de representar los datos calculados con el modelo frente a los medidos, y RSS la suma del cuadrado de los residuales.

Asimismo se representa gráficamente la curva de disipación del herbicida en función del tiempo calculada con cada cinética, el gráfico de residuales, y la recta entre los valores calculados con cada modelo y los observados en campo.

Isoproturon

En las Figuras 5.21 y 5.22, se muestran los contenidos en Isoproturon obtenidos en los muestreos de los ensayos en campo efectuados durante los años 2002-2003 y 2003-2004.

La cinética escogida para ajustar los datos experimentales fue el modelo HS (recuadrada), en lugar de la de 1^{er} orden, debido a que en el campo se produjeron fenómenos que retardaban la disipación haciéndola bifásica.

La desaparición del herbicida siguió un patrón diferente en los dos ensayos. En el segundo las muestras se degradaban más rápidamente al principio y de manera más lenta después, pero la persistencia en ambos era análoga. Debido a esto, los DT_{50} de ambos ensayos fueron diferentes, mientras que los DT_{90} resultaron similares (Tabla 5.8). Análogamente, el tiempo de ruptura en el 1^{er} ensayo fue mucho mayor que en el 2^{do}. Estos efectos podrían explicarse, ya que en el 2^{do} ensayo llovió mucho el primer mes después de realizar el tratamiento, lo que aumentó la degradación del Isoproturon.

La disipación del Isoproturon era rápida, al cabo de 46-47 días, quedaba menos del 10% de la aplicación inicial, pero era persistente, ya que hasta una media de 300 días, seguía detectándose debido a que se descomponía por acción microbiana, y ésta era poco abundante en el suelo del ensayo debido a su bajo contenido en materia orgánica, lo que dificultaba la descomposición.

A pesar de las variaciones obtenidas en los valores, los DT_{50} y sus contenidos residuales (DT_{90}) entraron dentro del rango observado en la literatura [29,77-78].

Según la Tabla 5.1, el Isoproturon es químicamente estable, medianamente soluble en agua [80], pero con baja movilidad, detectándose mínimamente por debajo de los 10 cm y sin encontrar su presencia en las aguas subterráneas [78,81]. Su adsorción está directamente relacionada con el contenido en materia orgánica del suelo [15] y la arcilla [80]. Teniendo esto en cuenta y en vista de los resultados, se deduce que el Isoproturon es un compuesto que se degrada rápidamente en este suelo porque no está muy adsorbido, pero es persistente debido a que su degradación microbiana no está promovida por el bajo contenido en materia orgánica del suelo, a pesar de la presencia del cultivo, que incrementaba la presencia de microorganismos en estudios similares [82].

Isoproturon 1

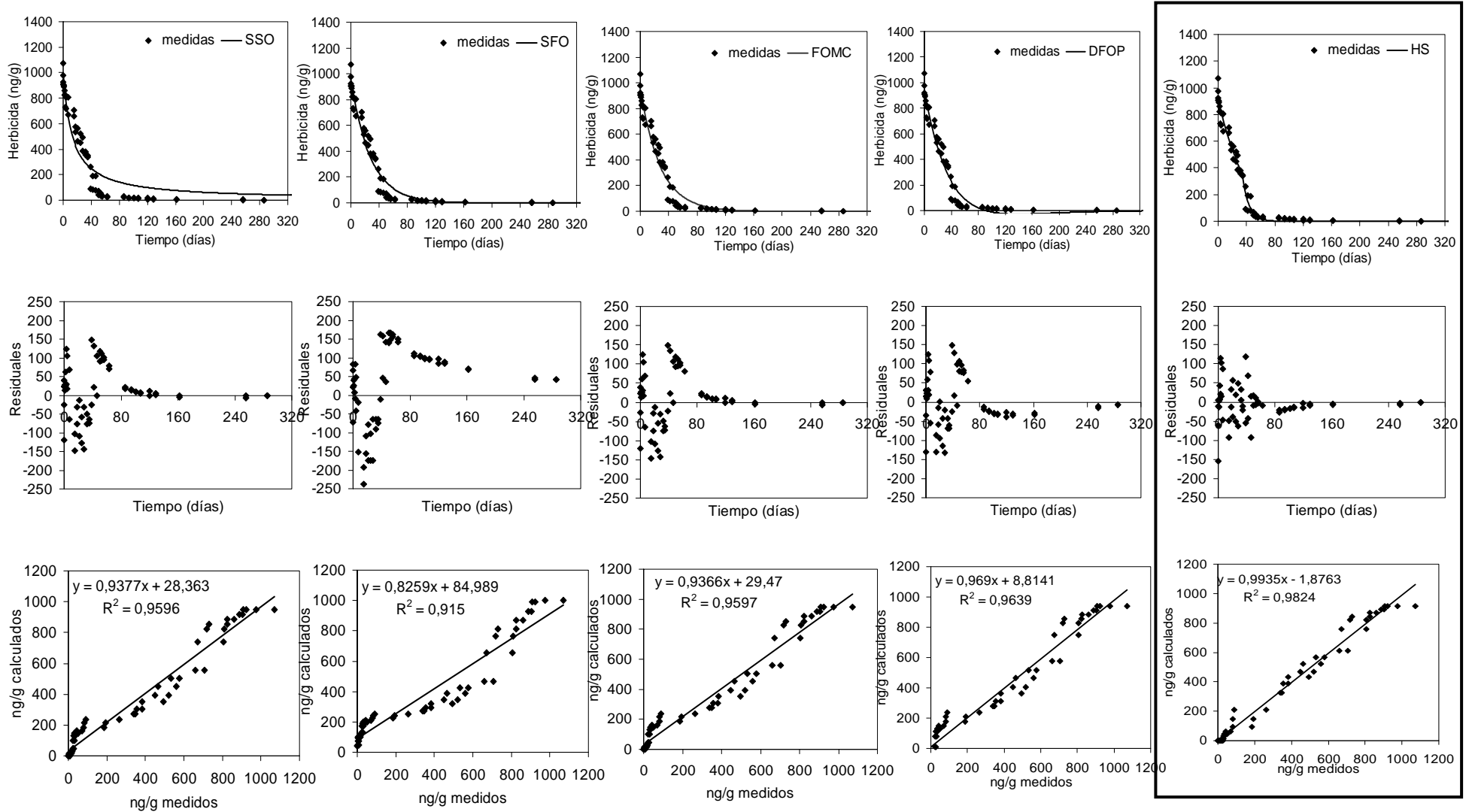


Figura 5.21. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Isoproturon en el 1^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Isoproturon 2

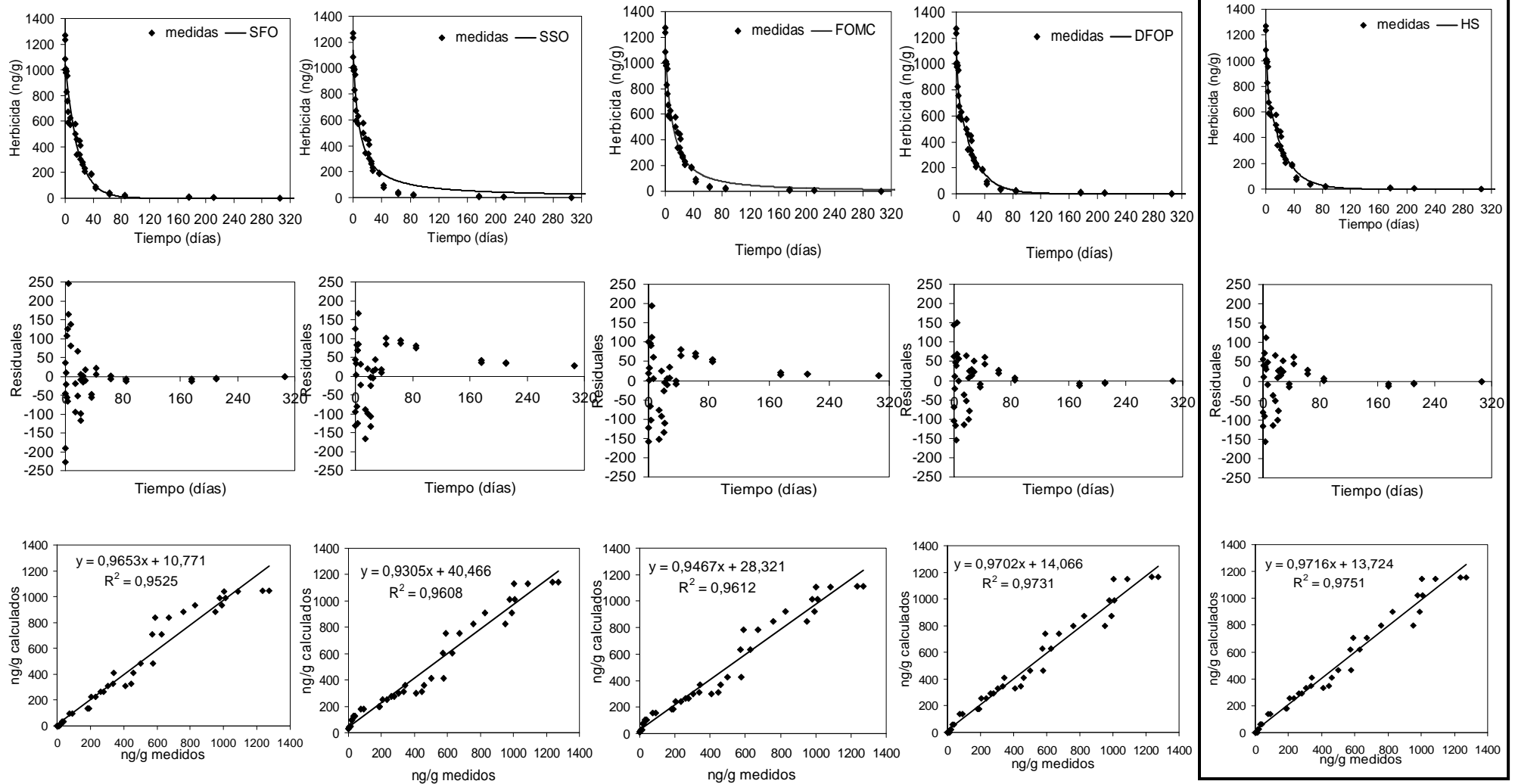


Figura 5.22. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Isoproturon en el 2^{do} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Tabla 5.8. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del Isoproturon en el 1^{er} y 2^{do} ensayo en campo.

ISOPROTURON 1									
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS
SFO	Mo	950,77	118,90	0,000253803	DT ₅₀	19,5	0,960 28,36 0,94	391,87 0,05	15,78 297057,65
	k	0,035548	0,009651		DT ₉₀	64,8			
SSO	Mo	998,80	125,78	0,001021332	DT ₅₀	13,2	0,915 84,99 0,83	504,70 0,07	26,45 715255,37
	k	0,000076	0,000023		DT ₉₀	118,9			
FOMC	Mo	949,85	91,47		DT ₅₀	19,6	0,960 29,47 0,94	389,64 0,05	15,78 292146,93
	α	33098,35	661747		DT ₉₀	65,2			
	β	936681,53	18532000						
DFOP	Mo	941,38	66,99	0,2755816	DT ₅₀	20,8	0,964 8,81 0,97	381,30 0,05	14,47 257327,91
	g	-6,13	0,38		DT ₉₀	59,5			
	K ₁	0,020082	0,033491						
	K ₂	0,021741	0,014619		0,07129				
HS	Mo	915,72	23,82	6,0074E-17	DT _{50f}	25,8	0,982 -1,88 0,99	271,89 0,04	8,32 128211,94
	tb	33,98	1,34		DT _{90f}	85,7			
	K ₁	0,026857	0,002298		DT _{50s}	32,0			
	K ₂	0,112511	0,012982		DT _{90s}	46,3			
ISOPROTURON 2									
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS
SFO	Mo	1043,67	159,20	0,005875512	DT ₅₀	12,5	0,953 10,77 0,97	634,34 0,09	14,17 288118,01
	k	0,055248	0,020871		DT ₉₀	41,7			
SSO	Mo	1140,16	171,01	0,009796156	DT ₅₀	7,9	0,961 40,47 0,93	554,13 0,07	12,77 246074,81
	k	0,000111	0,000046		DT ₉₀	71,0			
FOMC	Mo	1113,01	146,18		DT ₅₀	9,0	0,961 28,32 0,95	530,84 0,07	12,71 236096,57
	α	1,40	1,72		DT ₉₀	58,7			
	β	14,16	27,10						
DFOP	Mo	1166,73	122,00	0,2840396	DT ₅₀	8,6	0,973 14,07 0,97	451,87 0,06	9,63 162503,74
	g	0,28	0,29		DT ₉₀	46,6			
	K ₁	0,565912	0,982181						
	K ₂	0,042276	0,020209		0,02178				
HS	Mo	1154,57	4,06	1,27916E-08	DT _{50f}	5,6	0,975 13,72 0,97	434,61 0,06	9,01 150148,15
	tb	4,00	1,36		DT _{90f}	18,6			
	K ₁	0,124012	0,017509		DT _{50s}	8,7			
	K ₂	0,041820	0,000548		DT _{90s}	47,2			

Trialato

En las Figuras 5.23 y 5.24, se muestran los contenidos en Trialato obtenidos en los muestreos de los ensayos en campo efectuados durante los años 2002-2003 y 2003-2004.

Se observa en los dos ensayos, que el modelo de 1^{er} orden subestimaba los valores residuales, mientras que los bifásicos y el de 2^{do} orden eran los que mejor lo ajustaban, análogamente a lo encontrado en un ensayo de persistencia en contenedores [34]. En el 2^{do} ensayo, se ha seleccionado DFOP, ya que predecía mejor los valores iniciales de concentración en el suelo que el modelo HS.

El alto contenido en arena del suelo y la escasa presencia de coloides, hacía que las tasas de volatilización fueran elevadas, al no encontrarse adsorbido el herbicida en este tipo de suelo [33]. Este efecto se apreció sobre todo en el 1^{er} ensayo, donde a diferencia del 2^{do}, no se había incorporado el herbicida al suelo y se perdió inicialmente más de la mitad del herbicida, a pesar de haber realizado ambos tratamientos en días que no había viento. Este resultado era análogo al encontrado para un estudio de volatilización del Trialato [33]. Aun así, la disipación fue muy rápida incluso tras la incorporación al suelo del herbicida, ya que los DT₅₀-DT₉₀ de ambos ensayos eran similares y excesivamente rápidos (Tabla 5.9), lo que sugería que en el campo, su volatilización era tan importante que no le afectaban las diferencias climáticas entre ensayos [33].

La disipación del Trialato era muy rápida frente a la encontrada en la bibliografía (Tabla 5.1), ya que al cabo de 17-22 días, quedaba menos del 10% de la aplicación inicial, pero resultó ser el más persistente entre los ensayados, ya que se comprobó que seguía permaneciendo después de los 480 días que duró el 2^{do} ensayo. Estos elevados contenidos residuales entraban dentro de lo observado en la literatura [34,83]. La volatilización aumentaba con la temperatura, no obstante también se producía un aumento de pérdida de agua del suelo, pudiendo dejar ésta más centros activos de adsorción libres para el herbicida que resultaba, así, más retenido.

En vista de los resultados en campo y de las características del herbicida (Tabla 5.1), se deduce que el Trialato se comportó como un compuesto que se volatilizaba fuertemente al inicio del ensayo, y posteriormente se adsorbía al suelo haciendo que su persistencia fuera muy elevada debido a que su degradación microbiana a largo plazo no se veía favorecida por el bajo contenido en materia orgánica y humedad de éste.

Triatalo 1

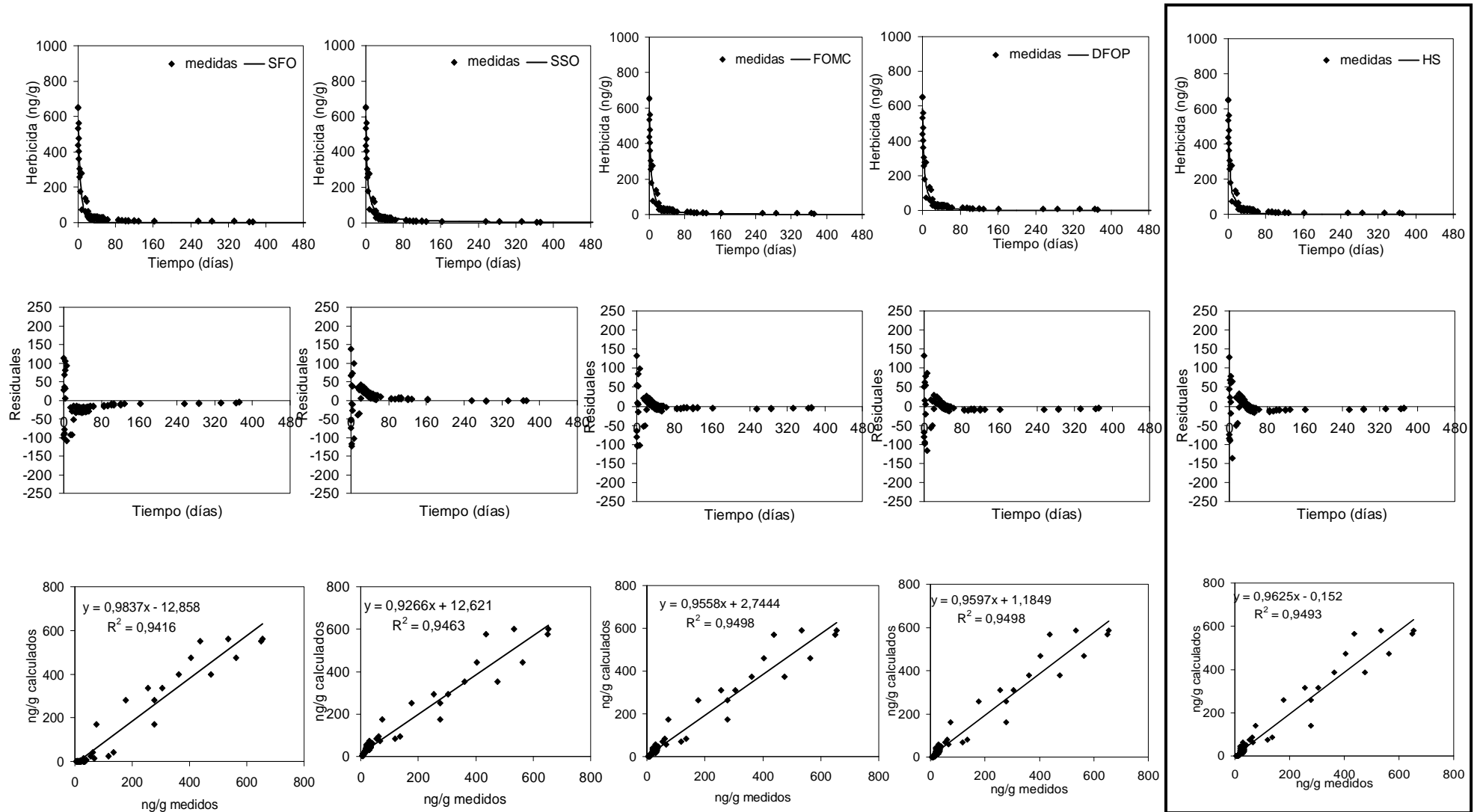


Figura 5.23. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Trialato en el 1º ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Trialato 2

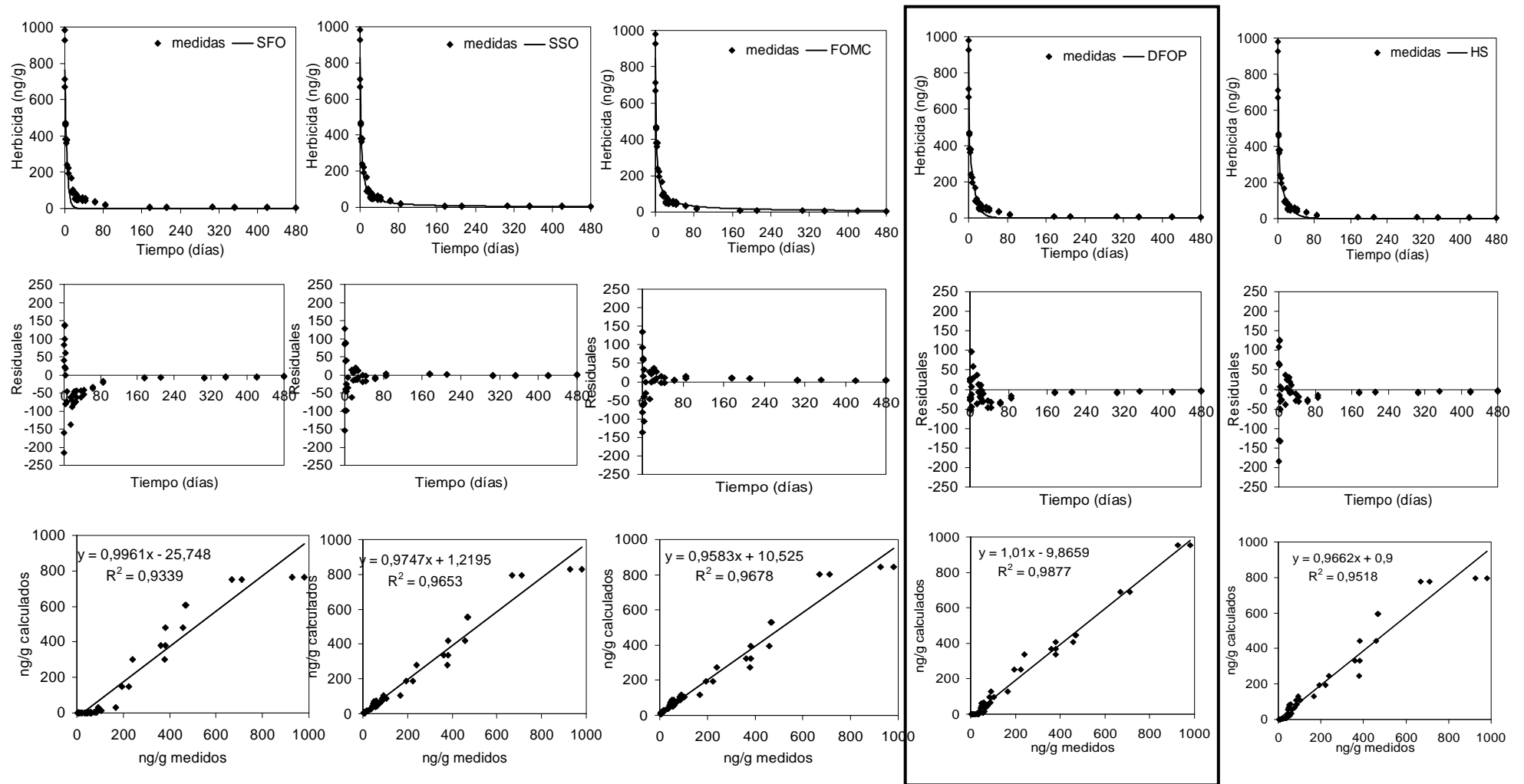


Figura 5.24. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Trialato en el 2º ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Tabla 5.9. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del Trialato en el 1^{er} y 2^{do} ensayo en campo.

TRIALATO 1									
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS
SFO	Mo	561,80	61,68	0,000935914	DT ₅₀	4,0	0,942	194,51	22,40
	k	0,172113	0,053047		DT ₉₀	13,4	-12,86		128069,36
SSO	Mo	600,59	59,49	0,000180122	DT ₅₀	2,9	0,946	176,22	15,67
	k	0,000583	0,000155		DT ₉₀	25,7	12,62		104372,63
FOMC	Mo	588,71	49,80		DT ₅₀	3,3	0,950	174,01	12,41
	α	1,48	0,89		DT ₉₀	20,5	2,74		95480,67
	β	5,51	5,48				0,96		0,06
DFOP	Mo	585,49	37,11	0,0054029	DT ₅₀	3,3	0,950	174,59	12,56
	g	0,78	0,22		DT ₉₀	21,2	1,18		95817,28
	K ₁	0,286610	0,109157				0,96		0,06
	K ₂	0,038950	0,035982		0,14155				
HS	Mo	579,57	18,10	5,37063E-17	DT _{50f}	3,4	0,949	176,04	13,25
	tb	7,64	2,54		DT _{90f}	11,3	-0,15		97436,73
	K ₁	0,203035	0,017967		DT _{50s}	-9,4	0,96		0,06
	K ₂	0,050264	0,020630		DT _{90s}	22,6			
TRIALATO 2									
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS
SFO	Mo	765,87	104,76	0,003811728	DT ₅₀	3,0	0,934	342,09	31,61
	k	0,234369	0,083796		DT ₉₀	9,8	-25,75		227479,70
SSO	Mo	827,93	98,52	0,001808999	DT ₅₀	2,0	0,965	242,27	19,22
	k	0,000591	0,000192		DT ₉₀	18,4	1,22		97119,18
FOMC	Mo	845,06	83,18		DT ₅₀	1,8	0,968	223,17	18,71
	α	0,77	0,42		DT ₉₀	22,6	10,53		90272,61
	β	1,20	1,63				0,96		0,05
DFOP	Mo	953,93	62,68	0,0000027	DT ₅₀	0,4	0,988	144,44	9,46
	g	0,49	0,13		DT ₉₀	17,2	-9,87		38410,75
	K ₁	9,953129	1,910730				1,01		0,03
	K ₂	0,095221	0,030158		0,00147				
HS	Mo	796,83	26,14	2,04719E-14	DT _{50f}	2,4	0,952	275,76	24,03
	tb	4,25	1,06		DT _{90f}	7,9	0,90		135559,29
	K ₁	0,292707	0,026283		DT _{50s}	-5,1	0,97		0,07
	K ₂	0,059214	0,017663		DT _{90s}	22,1			

Terbutrina

En las Figuras 5.25 y 5.26, se muestran los contenidos en Terbutrina obtenidos en los muestreos de los ensayos en campo efectuados durante los años 2002-2003 y 2003-2004.

La Terbutrina presentó un patrón de disipación similar al del Isoproturon pero menos acusado. Su desaparición era algo más rápida en el 2^{do} ensayo, aunque su persistencia se mantenía igual en los dos ensayos, lo que produjo que los DT₅₀ de ambos fueran diferentes mientras que los DT₉₀ resultaban similares (Tabla 5.10). Se sabe que la Terbutrina es muy sensible a las condiciones específicas de los ensayos en cuanto a tipo de suelo, y condiciones de humedad y temperatura, lo que explicaba el efecto observado, ya que en el 2^{do} ensayo llovió mucho el primer mes después de realizar el tratamiento, lo que podría haber aumentado la degradación del herbicida.

La Terbutrina sufrió procesos de volatilización durante los días siguientes a su aplicación, pero en menor medida que el Trialato en las mismas condiciones, por lo que sus DT₅₀-DT₉₀ fueron mayores. Estos datos concuerdan con los encontrados para un estudio de volatilización de la Terbutrina teniendo en cuenta que es medianamente volátil [33]. En el mismo estudio se sugiere que se mineralizaba muy débilmente debido probablemente a que los fenómenos de adsorción al suelo impedían su biodegradación [33,84], lo que explicaba su persistencia en el suelo del ensayo.

Se degradaba poco en este suelo básico y pobre y en este clima árido, ya que la actividad microbiana juega un papel importante en su degradación, y la escasa humedad del suelo no favorece el crecimiento microbiano, análogamente a lo encontrado en las referencias bibliográficas [83,85]. Al cabo de 56-61 días, quedaba menos del 10% de la aplicación inicial, siendo persistente, ya que hasta después de una media de 300 días, siguió detectándose, resultados que concordaban con la bibliografía [34]. Se había encontrado en la literatura que se degradaba más lentamente que las Fenilureas (Isoproturon) [79], lo que también se comprobó al ser mayores sus DT₉₀.

En condiciones de laboratorio, se obtenía normalmente un buen ajuste de la degradación microbiana en el suelo a una cinética de orden uno, lo que indicaba que en el campo le afectaban otros procesos que hacían su cinética bifásica, principalmente la adsorción y el escaso crecimiento microbiano.

Terbutrina 1

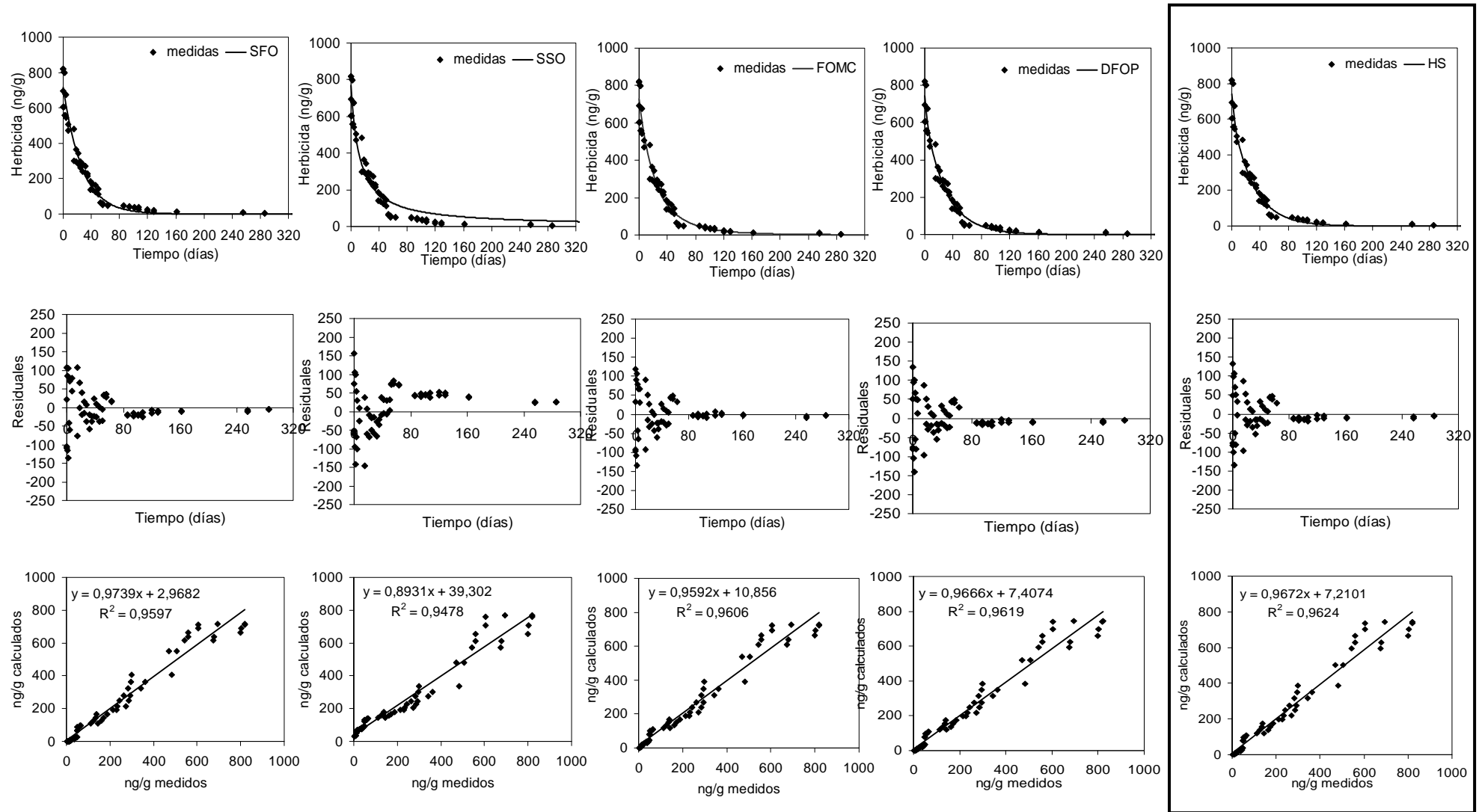


Figura 5.25. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para la Terbutrina en el 1^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Terbutrina 2

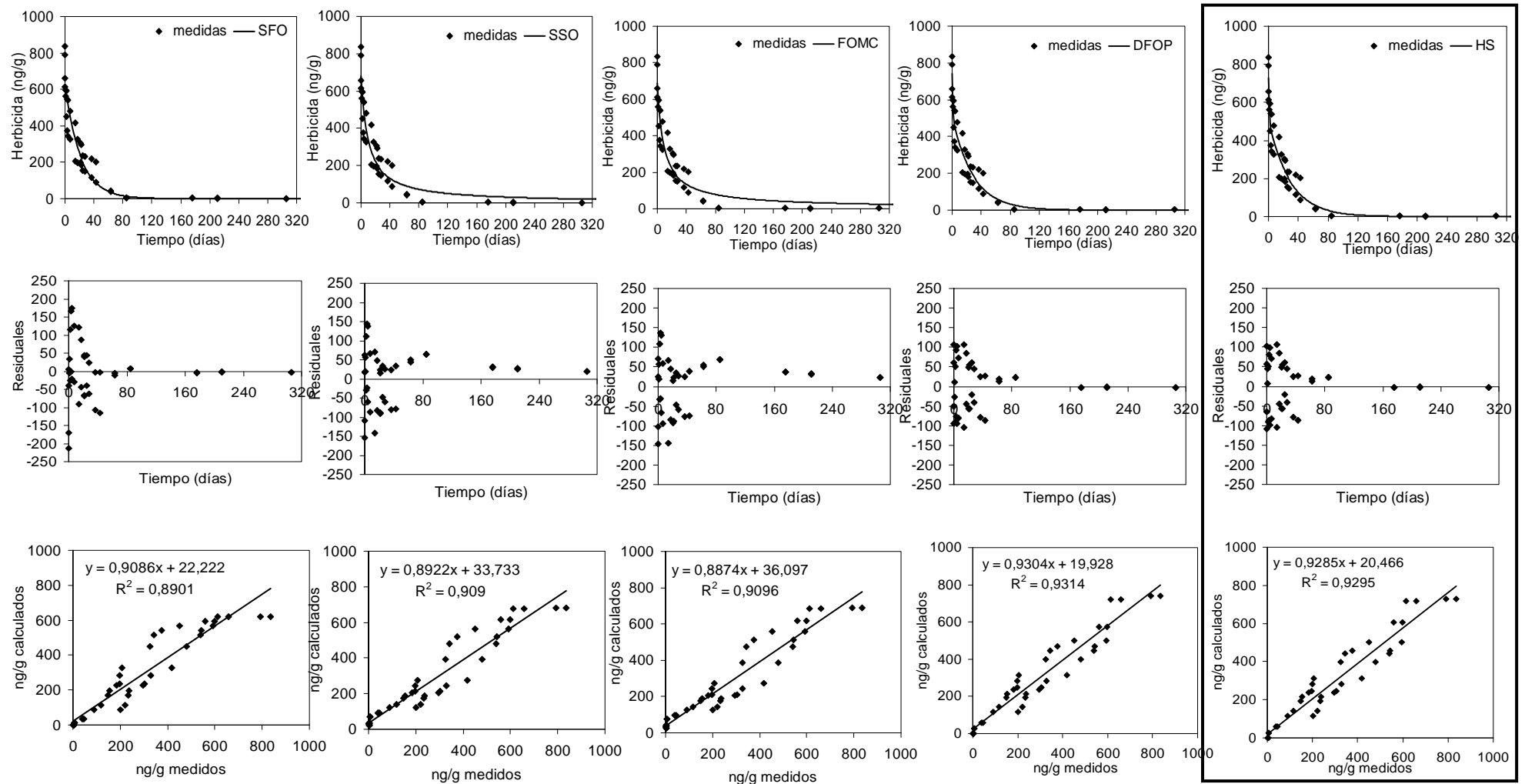


Figura 5.26. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para la Terbutrina en el 2^{do} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Tablas 5.10. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación de la Terbutrina en el 1^{er} y 2^{do} ensayo en campo.

TERBUTRINA 1										
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx	r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	714,72	85,15	0,000137996	DT ₅₀	18,3	0,960	2,97	7,67	
	k	0,037781	0,009756		DT ₉₀	60,9				154079,02
SSO	Mo	768,58	91,25	0,00062696	DT ₅₀	11,7	0,948	39,30	13,41	
	k	0,000111	0,000033		DT ₉₀	105,2				218154,38
FOMC	Mo	726,81	69,26		DT ₅₀	16,8	0,961	10,86	6,88	
	α	4,51	15,81		DT ₉₀	67,3				147883,68
	β	101,15	413,77							0,96
DFOP	Mo	744,51	49,25	3,28973E-11	DT ₅₀	15,9	0,962	7,41	6,21	
	g	0,16	0,70		DT ₉₀	64,5				143496,44
	K ₁	0,242467	0,030148							0,97
	K ₂	0,033041	0,077187							
HS	Mo	742,59	21,44	7,47368E-07	DT _{50f}	12,4	0,962	7,21	5,90	
	tb	7,00	4,52		DT _{90f}	41,3				141598,03
	K ₁	0,055734	0,010353		DT _{50s}	16,1				0,97
	K ₂	0,033335	0,003681		DT _{90s}	64,4				
TERBUTRINA 2										
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx	r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	621,49	91,26	0,004938018	DT ₅₀	15,1	0,890	22,22	16,37	
	k	0,045931	0,016908		DT ₉₀	50,1				244072,22
SSO	Mo	681,64	98,27	0,008	DT ₅₀	9,5	0,909	33,73	13,32	
	k	0,000154	0,000061		DT ₉₀	85,8				201927,90
FOMC	Mo	689,56	90,47		DT ₅₀	9,0	0,910	36,10	13,58	
	α	0,89	0,77		DT ₉₀	93,7				201384,00
	β	7,58	12,77							0,89
DFOP	Mo	741,11	76,83	0,197	DT ₅₀	9,1	0,931	19,93	8,50	
	g	0,32	0,18		DT ₉₀	55,9				151554,54
	K ₁	1,047767	1,216160							0,93
	K ₂	0,034360	0,012989		0,00601					
HS	Mo	727,30	34,01	0,000501828	DT _{50f}	3,7	0,930	20,47	9,02	
	tb	2,42	0,92		DT _{90f}	12,5				155600,77
	K ₁	0,184891	0,051633		DT _{50s}	9,6				0,93
	K ₂	0,034203	0,004942		DT _{90s}	56,7				

Pendimetalina

En las Figuras 5.27 y 5.28, se muestran los contenidos en Pendimetalina obtenidos en los muestreos de los ensayos en campo efectuados durante los años 2002-2003 y 2003-2004.

Al principio del ensayo sufrió una disipación muy rápida influida por la volatilización, al igual que el Trialato, siendo sus DT_{50} también muy bajos. Se observaron resultados similares en otros estudios en campo para este herbicida, donde la mayor parte se evaporaba en las primeras semanas [86], o se descomponía por efecto de la luz [87], y el resto se disipaba lentamente de forma química o biológica [86]. De la misma manera, pasado este periodo inicial, la desaparición disminuía en el ensayo, y se acercaba más a la de la Terbutrina, por lo que su persistencia y sus DT_{90} eran más parecidos. Al cabo de 50-57 días, quedaba menos del 10% de la aplicación inicial, pero hasta después de 340 días no dejaba de detectarse. La Pendimetalina se ha descrito como moderadamente persistente en el suelo hasta una estación completa tras la aplicación debido a su limitada solubilidad y fuerte adsorción en el suelo (Tabla 5.1) [28,81,88], viéndose favorecida su persistencia en este ensayo en particular, ya que los procesos de biodegradación eran reducidos en las condiciones climáticas y el suelo de la parcela. Estos contenidos residuales entraban dentro del rango observado en la literatura [86,89,90], teniendo en cuenta las bajas temperaturas registradas durante los meses de invierno en los ensayos.

Los DT_{50} encontrados eran en general más bajos que los de la literatura para estudios similares, aunque los datos eran altamente variables, referenciándose valores desde 6 a 13 días [90], hasta 27 a 155 días (estudios para la Directiva 91/414/CEE). La desaparición fue igual en ambos ensayos, con DT_{50} - DT_{90} muy rápidos (Tabla 5.11), lo que demostraba que las diferencias en humedad entre años no afectaban a este herbicida con elevada volatilidad en este suelo con alto contenido en arena y bajo en coloides, efecto ya observado para el Trialato.

A la vista de los resultados, se deducía que la Pendimetalina era un compuesto que se degradaba rápidamente en este suelo al volatilizarse ampliamente tras la aplicación, pero era persistente debido a que se adsorbía en cierta medida y su degradación microbiana no estaba favorecida en este tipo de suelo, a pesar de la presencia del cultivo, que incrementaba la presencia de microorganismos, y por tanto la degradación, en estudios similares [82].

Pendimetalina 1

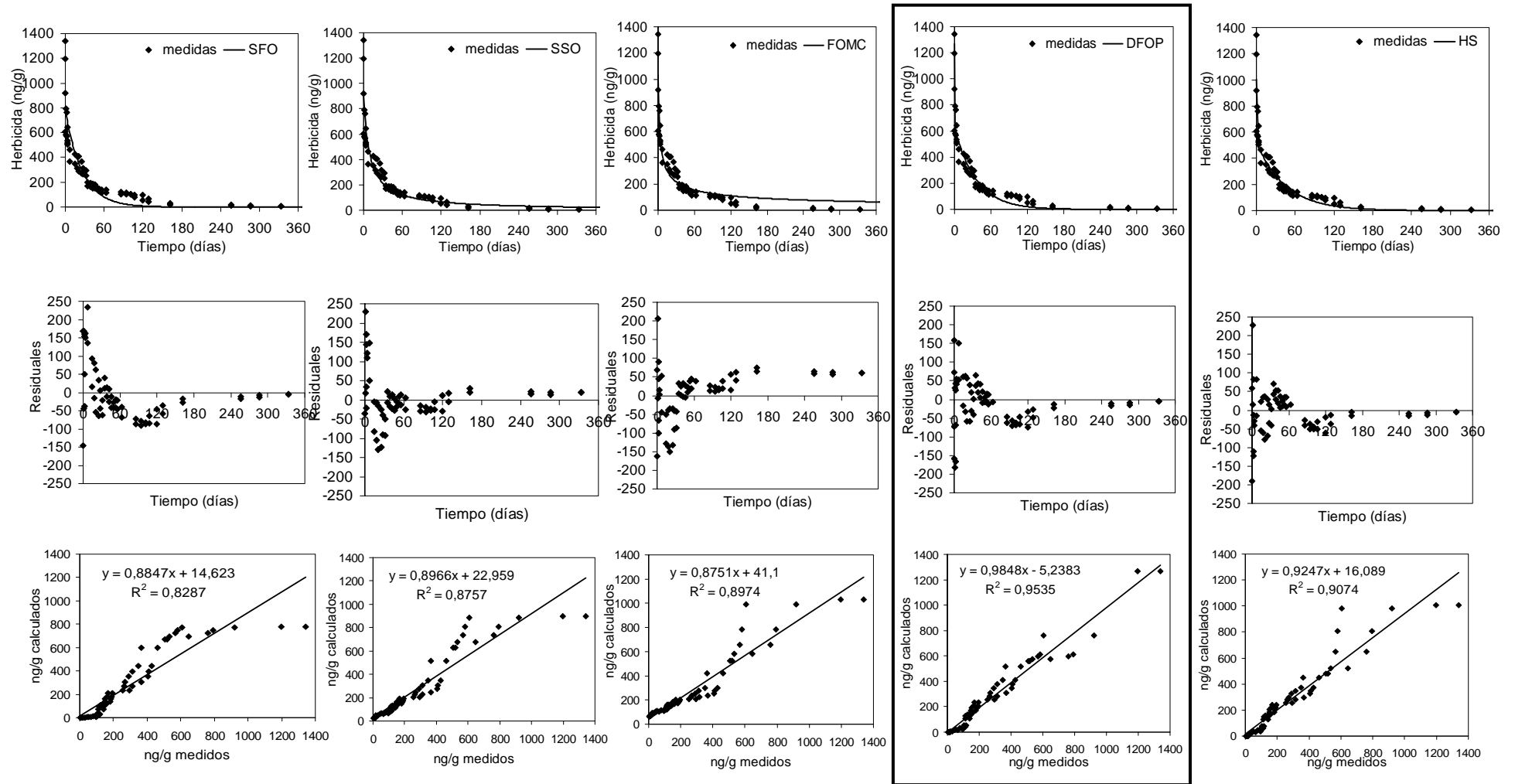


Figura 5.27. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para la Pendimetalina en el 1^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Pendimetalina 2

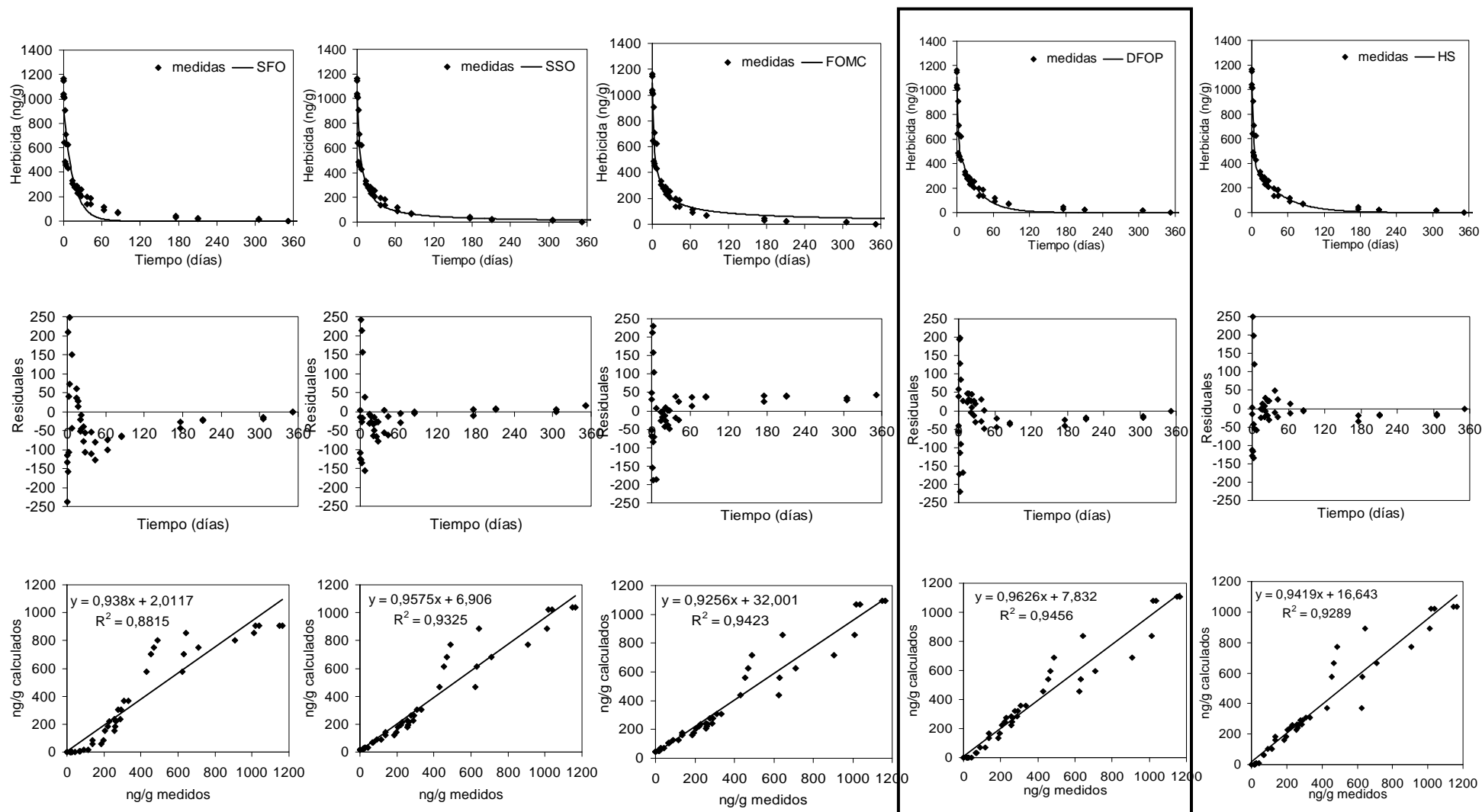


Figura 5.28. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para la Pendimetalina en el 2º ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Tablas 5.11. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación de la Pendimetalina en el 1^{er} y 2^{do} ensayo en campo.

PENDIMETALINA 1											
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	778,38	97,60	0,000254464	DT ₅₀	18,4	0,829	629,78	32,97		
	k	0,037728	0,010266		DT ₉₀	61,0				14,62	867375,34
SSO	Mo	896,08	110,09	0,000974938	DT ₅₀	9,4	0,876	536,69	26,43		
	k	0,000119	0,000037		DT ₉₀	84,2				22,96	606811,66
FOMC	Mo	1034,06	113,71		DT ₅₀	4,1	0,897	466,51	23,72		
	α	0,50	0,19		DT ₉₀	135,3				41,10	501522,51
	β	1,37	2,08							0,88	0,08
DFOP	Mo	1268,86	89,53	3,18087E-35	DT ₅₀	0,3	0,953	347,72	12,06		
	g	0,50	0,12		DT ₉₀	56,5				-5,24	234629,47
	K ₁	12,339224	0,449510							0,98	0,06
	K ₂	0,028327	0,007098		0,00009						
HS	Mo	1005,72	46,44	2,75117E-07	DT _{50f}	3,2	0,907	466,85	21,87		
	tb	3,33	0,72		DT _{90f}	10,5				16,09	451338,33
	K ₁	0,218298	0,038773		DT _{50s}	1,8				0,92	0,08
	K ₂	0,022449	0,003477		1,19194E-08	DT _{90s}				73,5	
PENDIMETALINA 2											
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	909,16	135,71	0,0049744	DT ₅₀	10,8	0,881	767,19	21,98		
	k	0,064463	0,023818		DT ₉₀	35,7				2,01	601457,33
SSO	Mo	1037,99	151,15	0,008	DT ₅₀	5,8	0,933	582,52	11,51		
	k	0,000167	0,000066		DT ₉₀	51,8				6,91	328762,57
FOMC	Mo	1094,87	139,60		DT ₅₀	4,2	0,942	508,76	8,40		
	α	0,62	0,32		DT ₉₀	82,1				32,00	276549,65
	β	2,05	2,70							0,93	0,08
DFOP	Mo	1106,27	105,76	0,03861	DT ₅₀	3,7	0,946	513,26	7,05		
	g	0,49	0,19		DT ₉₀	49,5				7,83	262876,08
	K ₁	0,617239	0,521829		0,122					0,96	0,08
	K ₂	0,032931	0,018131								
HS	Mo	1035,66	41,03	1,55558E-09	DT _{50f}	4,7	0,929	577,24	12,49		
	tb	7,21	1,68		DT _{90f}	15,7				16,64	341908,13
	K ₁	0,146857	0,019148		DT _{50s}	-9,2				0,94	0,09
	K ₂	0,022302	0,008440		0,005944445	DT _{90s}				63,0	

Flamprop

En las Figuras 5.29 y 5.30, se muestran los contenidos en Flamprop obtenidos en los muestreos de los ensayos en campo efectuados durante los años 2002-2003 y 2003-2004.

La desaparición del herbicida siguió el mismo patrón en los dos ensayos, siendo el herbicida que más lentamente se disipaba de los estudiados, debido probablemente a su poca volatilidad, tanto en forma de éster isopropilo como en forma de ácido, así como su escaso potencial para lixivarse (Tabla 5.1), y su mínima degradación por fotólisis [91].

Sus DT_{50} - DT_{90} fueron los mayores encontrados (Tabla 5.12), lo que sugería que en el campo se disipaba más lentamente que los otros herbicidas, de tal manera que hasta después de 130-155 días, no se reducía a menos del 10% de su aplicación inicial. Al mismo tiempo presentaba una persistencia similar a la Pendimetalina, ya que tenían que pasar 340 días para que no se detectase.

En vista de los resultados, se deducía que el Flamprop se disipaba muy lentamente en el suelo, ya que no era volátil, ni demasiado soluble en agua, por lo que no se desplazaba a otros compartimentos del medio ambiente, persistiendo en el suelo más tiempo al no fotodegradarse y no estar favorecida su degradación microbiana en este suelo seco y mayoritariamente inerte.

Flamprop 1

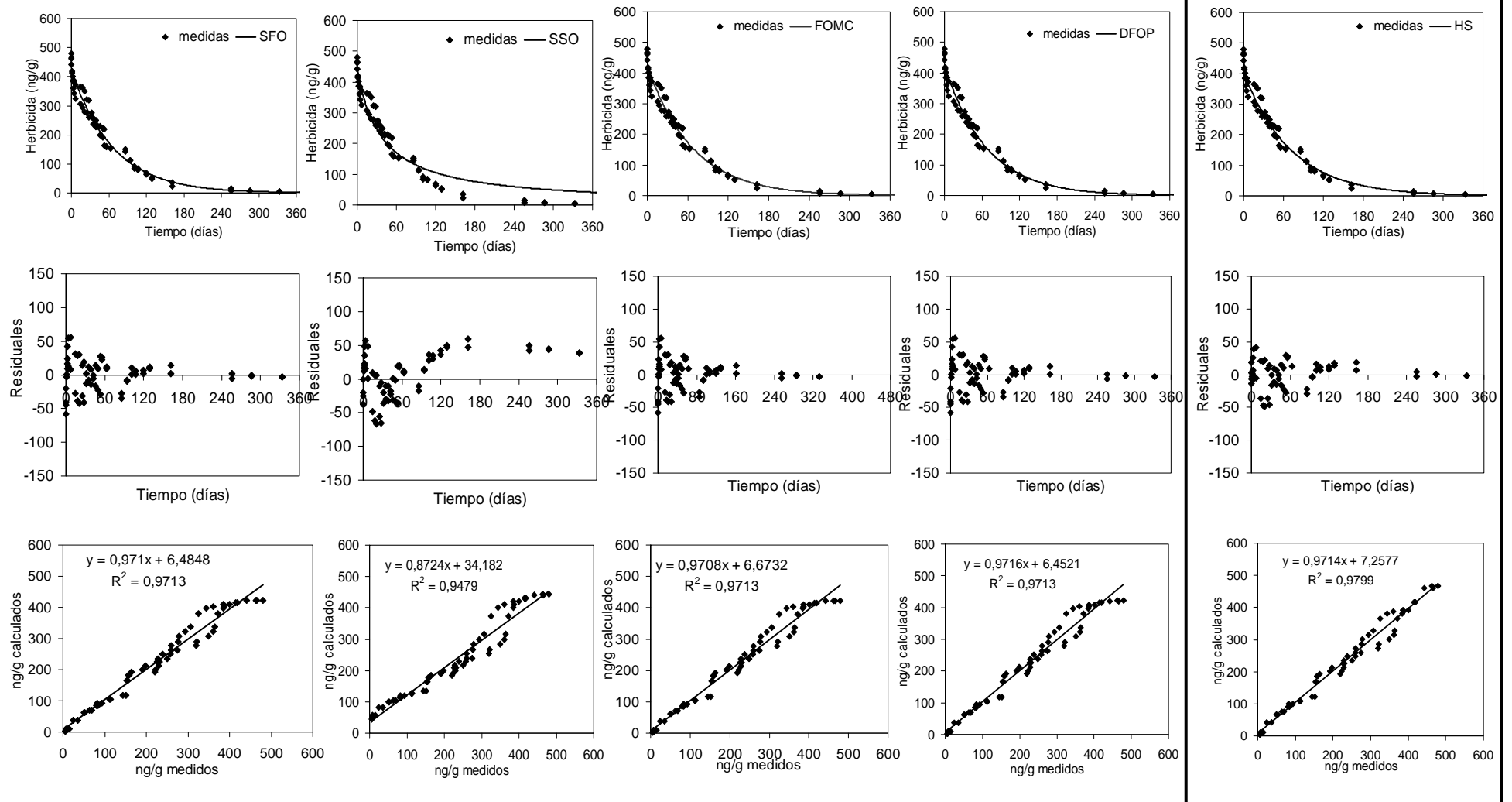


Figura 5.29. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Flamprop en el 1^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Flamprop 2

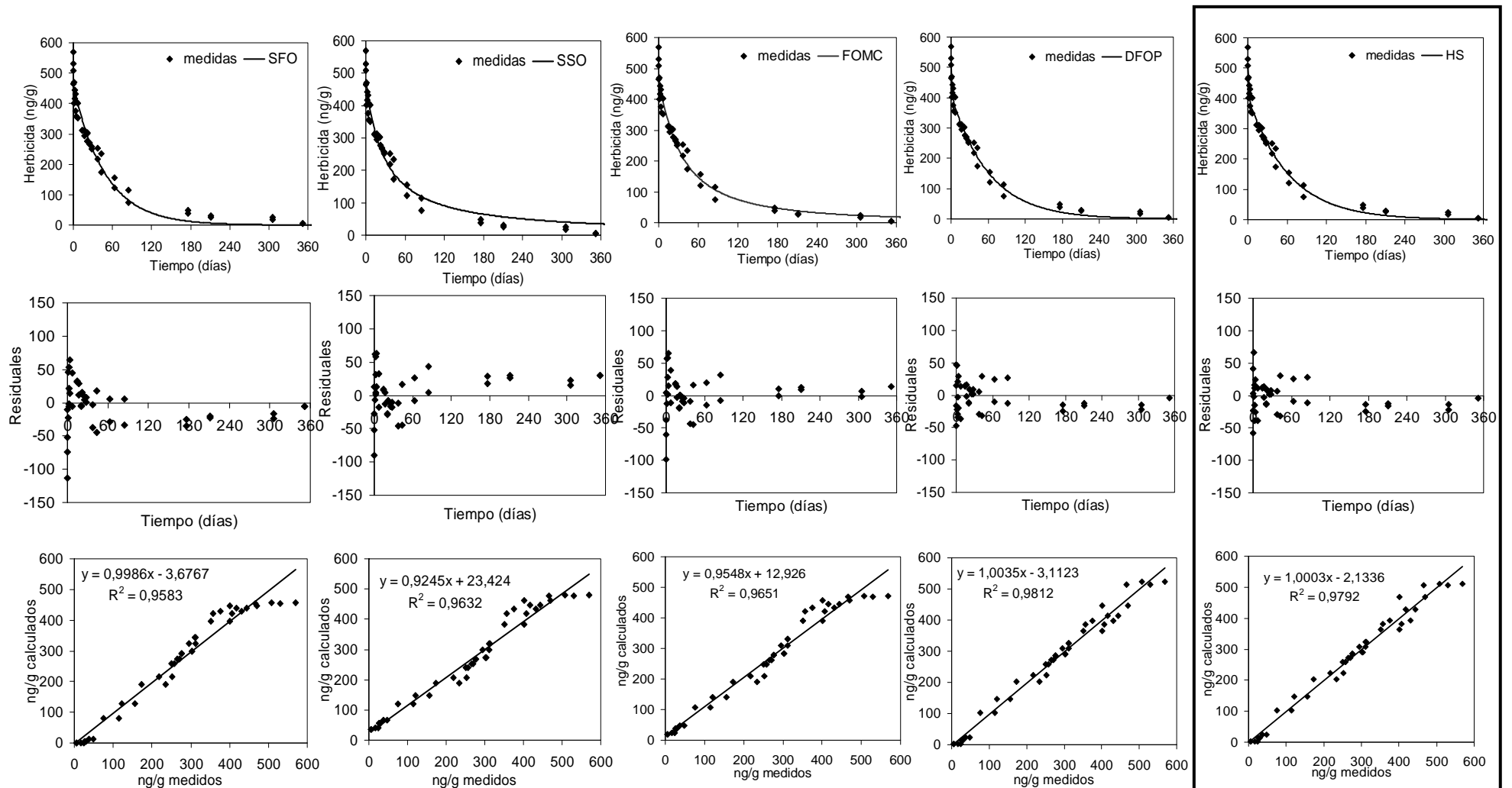


Figura 5.30. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Flamprop en el 2º ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Tablas 5.12. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del Flamprop en el 1^{er} y 2^{do} ensayo en campo.

FLAMPROP 1											
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	422,13	50,15	0,000528632	DT ₅₀	46,4	0,971	177,78	6,59		
	k	0,014927	0,004336		DT ₉₀	154,3				6,48	33822,47
SSO	Mo	442,65	51,74	0,000625139	DT ₅₀	37,5	0,948	216,90	11,43		
	k	0,000060	0,000018		DT ₉₀	337,2				34,18	70562,06
FOMC	Mo	421,76	30,10		DT ₅₀	46,7	0,971	177,80	6,47		
	α	-118,08	1867,37		DT ₉₀	154,0				6,67	33676,33
	β	-7974,50	124660,00							0,97	0,04
DFOP	Mo	421,62	13,74	0,1847003	DT ₅₀	46,7	0,971	177,93	6,47		
	g	1,12	3,74		DT ₉₀	153,4				6,45	33672,23
	K ₁	0,014267	0,015771							0,97	0,04
	K ₂	0,010140	0,146270		0,47249						
HS	Mo	466,65	12,64	0,013577268	DT _{50f}	6,0	0,980	148,33	4,16		
	tb	1,44	0,65		DT _{90f}	20,1				7,26	23577,33
	K ₁	0,114708	0,050606		DT _{50s}	39,4				0,97	0,04
	K ₂	0,013913	0,000624		1,9344E-30	DT _{90s}				155,1	
FLAMPROP 2											
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	456,26	64,78	0,014844907	DT ₅₀	34,1	0,958	332,03	8,64		
	k	0,020324	0,009014		DT ₉₀	113,3				-3,68	46324,92
SSO	Mo	479,66	65,06	0,011097481	DT ₅₀	28,1	0,963	288,09	7,85		
	k	0,000074	0,000031		DT ₉₀	252,5				23,42	40801,18
FOMC	Mo	470,64	53,03		DT ₅₀	30,5	0,965	300,47	7,38		
	α	1,64	2,76		DT ₉₀	178,1				12,93	36679,12
	β	57,82	130,92							0,95	0,07
DFOP	Mo	522,34	56,35	0,1533060	DT ₅₀	27,5	0,981	230,20	3,73		
	g	0,22	0,17		DT ₉₀	125,8				-3,11	20462,89
	K ₁	0,940058	0,907129							1,00	0,06
	K ₂	0,016374	0,006880		0,01122						
HS	Mo	510,70	13,28	6,71361E-06	DT _{50f}	7,8	0,979	241,78	4,37		
	tb	3,17	0,77		DT _{90f}	26,1				-2,13	22531,60
	K ₁	0,088388	0,017690		DT _{50s}	28,8				1,00	0,06
	K ₂	0,016082	0,001392		2,66084E-14	DT _{90s}				128,9	

5.3.1.2. 3er Ensayo: 2004-2005

Se presentan los resultados conjuntamente del 1^{er} y 3^{er} ensayo para el Bromoxinil, único herbicida repetido en la misma parcela a una dosis diferente y en diferentes condiciones climatológicas (Figuras 5.32 y 5.33), para estudiar estos efectos en la disipación. El resto de herbicidas ensayados en el 3^{er} ensayo no se repitieron.

El muestreo durante el 3^{er} ensayo se realizó de forma más frecuente al principio del ensayo porque se sabía que los fenoxiácidos se degradaban rápidamente, lo que se apreciaba en las gráficas. De la misma manera, la duración del estudio fue menor ya que los herbicidas utilizados eran menos persistentes [85,92].

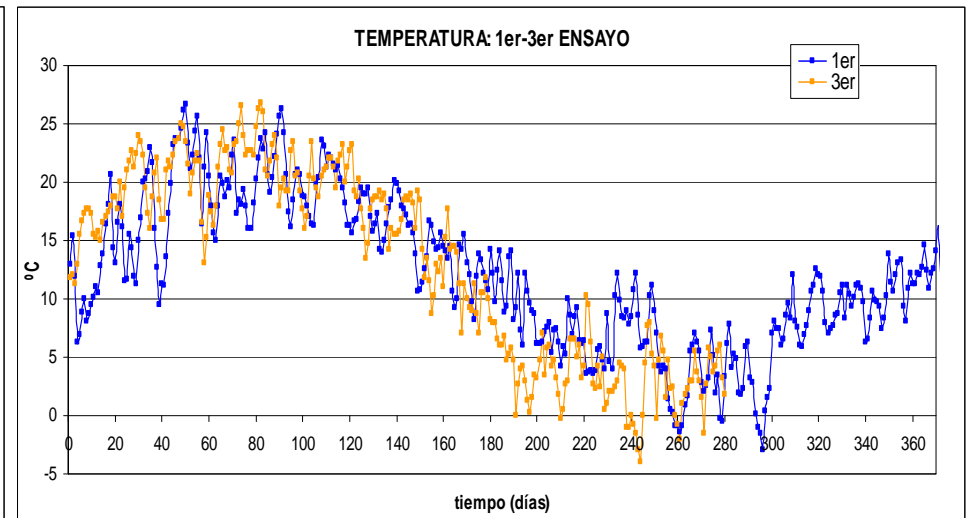
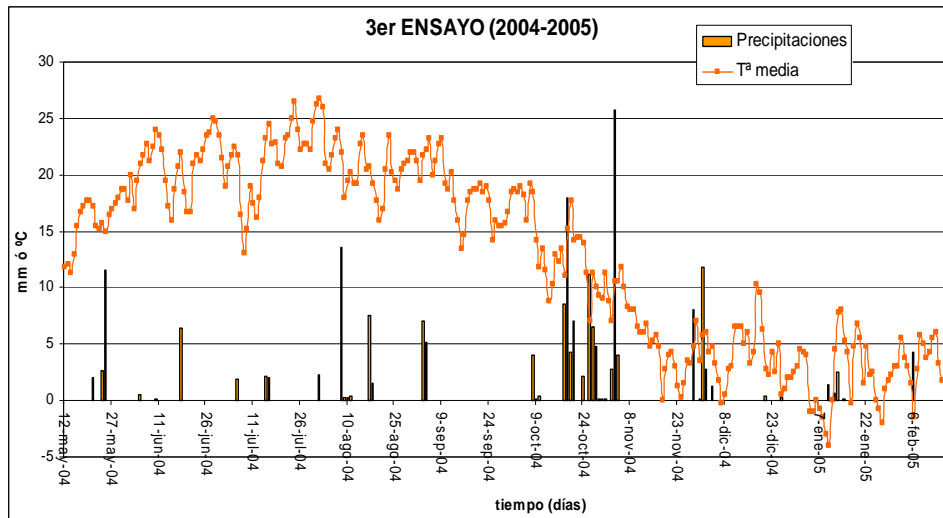
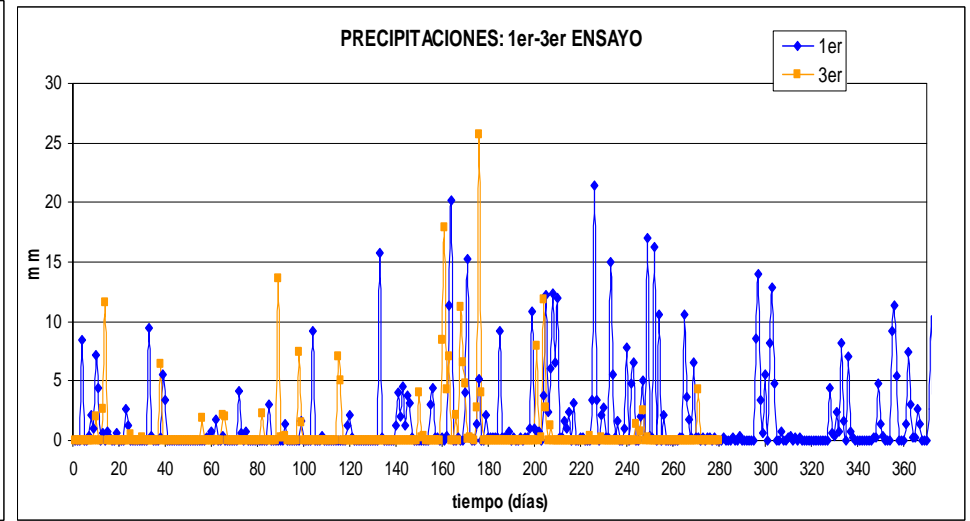
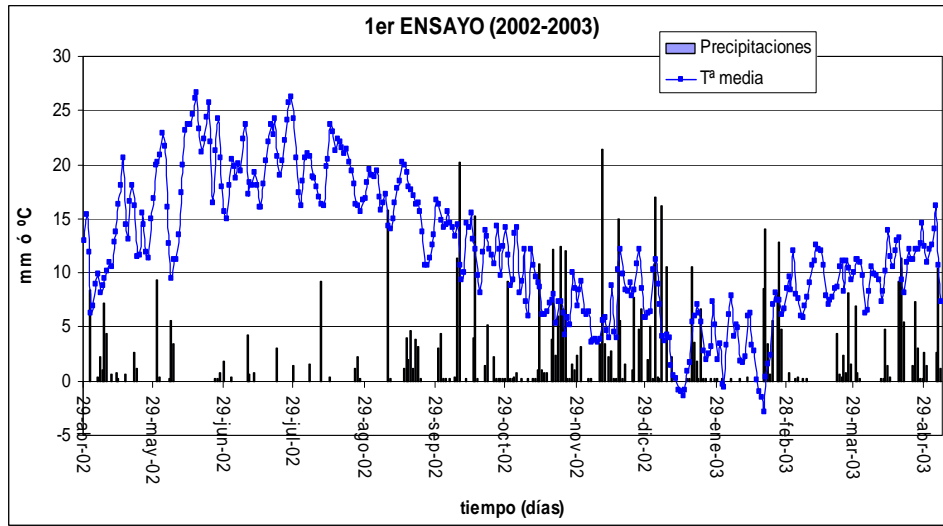
Hay que tener en cuenta que los tratamientos se produjeron en mayo, y los meses siguientes fueron calurosos y con escasas precipitaciones, lo que provocó la rápida disipación de todos los herbicidas, debido principalmente a procesos influidos por la temperatura, como la fotólisis o la volatilización. En general, los herbicidas aplicados no fueron persistentes, degradándose totalmente durante el verano, permaneciendo algo más el MCP, debido a que se había aplicado a la dosis más alta. La única excepción fue el Diclofop, ya que en las condiciones de este suelo (baja humedad y escasa materia orgánica) no estaban favorecidos los procesos de degradación microbiológicos lo que podía ser la causa de su mayor persistencia.

Los Fenoxiácidos se degradaron por vía microbiana, por eso sus cinéticas se ajustaron a modelos bifásicos, y fueron poco persistentes, debido a sus características físico-químicas, a las condiciones en que se desarrolló el ensayo y a que se aplicaron en dosis bajas.

Se observó que aquellos herbicidas que se aplicaron en forma de ésteres sufrieron mayores pérdidas en el primer día de tratamiento respecto de los que se aplicaron en forma de sales, ya que éstas no eran volátiles y permanecían en el suelo, a diferencia de los ésteres volátiles. El mayor problema que podían presentar las sales era su potencial lixiviación, fenómeno que no se produjo ya que el primer mes se registraron muy pocas precipitaciones, como se comprobaba en la Figura 5.33. En 24 h, los ésteres y las sales se hidrolizaban rápidamente a sus correspondientes ácidos y fenoles no volátiles, permaneciendo más en el suelo, susceptibles de degradarse.

La aplicación de las sales amina o de los ésteres para estudiar la disipación de los herbicidas era adecuada, ya que un estudio para el 2,4-D había demostrado que distintas sales y ésteres de este ácido sufrían la misma la disipación, y por tanto la forma de aplicación del herbicida no influía en los resultados del estudio ya que todas ellas eran rápidamente convertidas al ácido correspondiente [93].

No se presentaron datos para el Fenoxaprop p etil y el Mefenpir dietil porque, como ya se había comentado, no se pudieron estudiar las cinéticas de disipación al detectarse únicamente en los primeros días del ensayo, por ser su proporción en el producto comercial muy baja, obteniéndose muy pocos puntos para un ajuste adecuado de los modelos.



Figuras 5.18, 5.31. Temperaturas medias y Precipitaciones registradas durante el 3er ensayo en campo.

Figuras 5.32, 5.33. Comparación de Temperaturas medias y Precipitaciones entre el 1er y el 3er ensayo en campo.

A continuación se presentan en forma de tabla para cada uno de los herbicidas estudiados los parámetros optimizados con cada uno de los modelos cinéticos utilizados, así como los parámetros que definen la bondad del ajuste de cada modelo, tachando aquellos que no cumplen los criterios establecidos, y sombreando el modelo más idóneo. Asimismo se representa gráficamente la curva de disipación del herbicida en función del tiempo calculada con cada cinética, el gráfico de residuales y la recta entre los valores calculados y los observados.

Bromoxinil

En las Figuras 5.34 y 5.35, se muestran los contenidos en Bromoxinil obtenidos en los muestreos de los ensayos en campo efectuados durante los años 2002-2003 y 2004-2005.

Sus valores de DT_{50} eran similares para los dos ensayos a pesar de que el primero se llevó a cabo 1 mes antes, lo que explicaba que las temperaturas fueran casi $10^{\circ}C$ inferiores después del 1^{er} tratamiento frente al 3^{er}. Sin embargo, tardó más en disiparse en el 3^{er} ensayo ya que tenía valores más altos de DT_{90} (Tabla 5.13). Podría deberse a que el uso de combinaciones de varios herbicidas aplicados conjuntamente en este 3^{er} ensayo, producirían variaciones en su disipación respecto de las aplicaciones individuales en el 1^{er} ensayo, al competir por los sitios de adsorción e incluso por los microorganismos que pudieran detoxificarlos.

La pérdida producida el primer día se debía a la volatilidad del éster aplicado en el suelo, mientras que el fenol en el que se transformaba en 24 h [94], no era volátil y permanecía pese a no ser demasiado persistente.

Su disipación fue rápida, quedando menos del 10% de la aplicación inicial a los 12 - 30 días. Sin embargo, su persistencia, aunque tampoco muy alta, fue mayor en el 1^{er} ensayo probablemente porque se le aplicó a una dosis mayor. Los valores encontrados son similares a los bibliográficos [75], de tal manera que la vida media del éster octanoico fue muy pequeña, y casi no se detectó, mientras que el fenol formado a las 24 h, se disipaba en 2 meses [94].

El Bromoxinil, al ser poco lixiviable y poco volátil, se encontraba medianamente adsorbido al suelo (Tabla 5.1), por lo que se disipaba principalmente mediante la degradación microbiana, que aunque era débil por el bajo contenido en materia orgánica y humedad del suelo, resultaba suficiente para disipar este herbicida no persistente cuya proporción en el producto aplicado era muy baja.

Tablas 5.13. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del Bromoxinil en el 1^{er} y 3^{er} ensayo en campo.

BROMOXINIL 1										
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DT _x		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS	
SFO	Mo	222,71	21,30	0,00012417	DT ₅₀	2,7	0,959	81,87	24,20	
	k	0,255637	0,063549		DT ₉₀	9,0	-9,39		1,03	12353,08
SSO	Mo	233,88	18,84	2,75152E-05	DT ₅₀	2,1	0,960	74,96	19,21	
	k	0,002064	0,000457		DT ₉₀	18,6	3,75		0,95	8505,44
FOMC	Mo	231,42	16,21		DT ₅₀	2,2	0,961	73,12	19,22	
	α	1,22	0,66		DT ₉₀	16,4	1,28		0,97	8225,01
	β	2,91	2,91							
DFOP	Mo	226,30	11,95	0,0000234	DT ₅₀	2,5	0,963	71,24	18,68	
	g	0,90	0,10		DT ₉₀	12,3	2,21		0,06	7854,86
	K ₁	0,321709	0,070037				0,96			
	K ₂	0,016482	0,029933		0,29256					
HS	Mo	224,11	7,28	1,27812E-14	DT _{50f}	2,6	0,962	72,45	19,07	
	tb	9,28	2,12		DT _{90f}	8,7	1,95		0,06	8102,75
	K ₁	0,263866	0,022286		DT _{50s}	-102,5	0,96			
	K ₂	0,015703	0,018327		DT _{90s}	-0,1				
BROMOXINIL 3										
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DT _x		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS	
SFO	Mo	117,40	12,01	5,38284E-06	DT ₅₀	5,6	0,826	91,33	26,39	
	k	0,123755	0,025180		DT ₉₀	18,6	0,41		0,12	13868,36
SSO	Mo	133,97	10,77	5,03656E-07	DT ₅₀	3,2	0,877	73,83	15,65	
	k	0,002358	0,000421		DT ₉₀	28,5	4,69		0,88	9022,70
FOMC	Mo	135,03	10,82		DT ₅₀	3,0	0,878	72,01	15,99	
	α	0,90	0,42		DT ₉₀	30,6	5,36		0,87	8980,28
	β	2,61	2,59							
DFOP	Mo	134,27	8,46	0,0088679	DT ₅₀	3,0	0,882	70,96	14,81	
	g	0,62	0,15		DT ₉₀	29,7	5,13		0,09	8648,12
	K ₁	0,440479	0,179098				0,88			
	K ₂	0,044714	0,021550		0,02181					
HS	Mo	130,43	6,60	8,10197E-08	DT _{50f}	3,4	0,881	71,42	15,16	
	tb	5,81	1,33		DT _{90f}	11,4	5,10		0,09	8757,62
	K ₁	0,202708	0,032864		DT _{50s}	-4,8	0,88			
	K ₂	0,045681	0,013078		DT _{90s}	30,4				

Bromoxinil 1

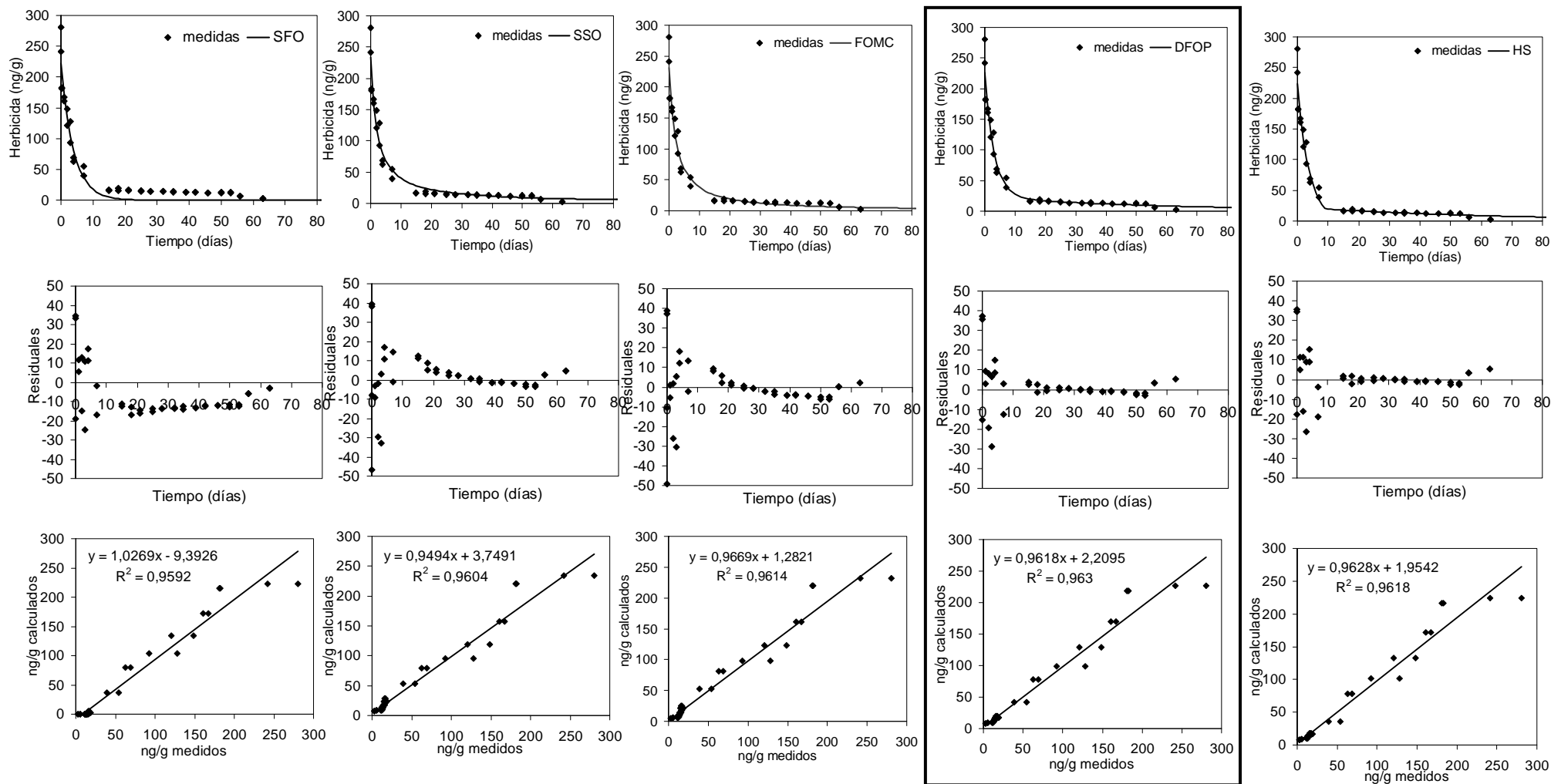


Figura 5.34. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Bromoxinil en el 1^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Bromoxinil 3

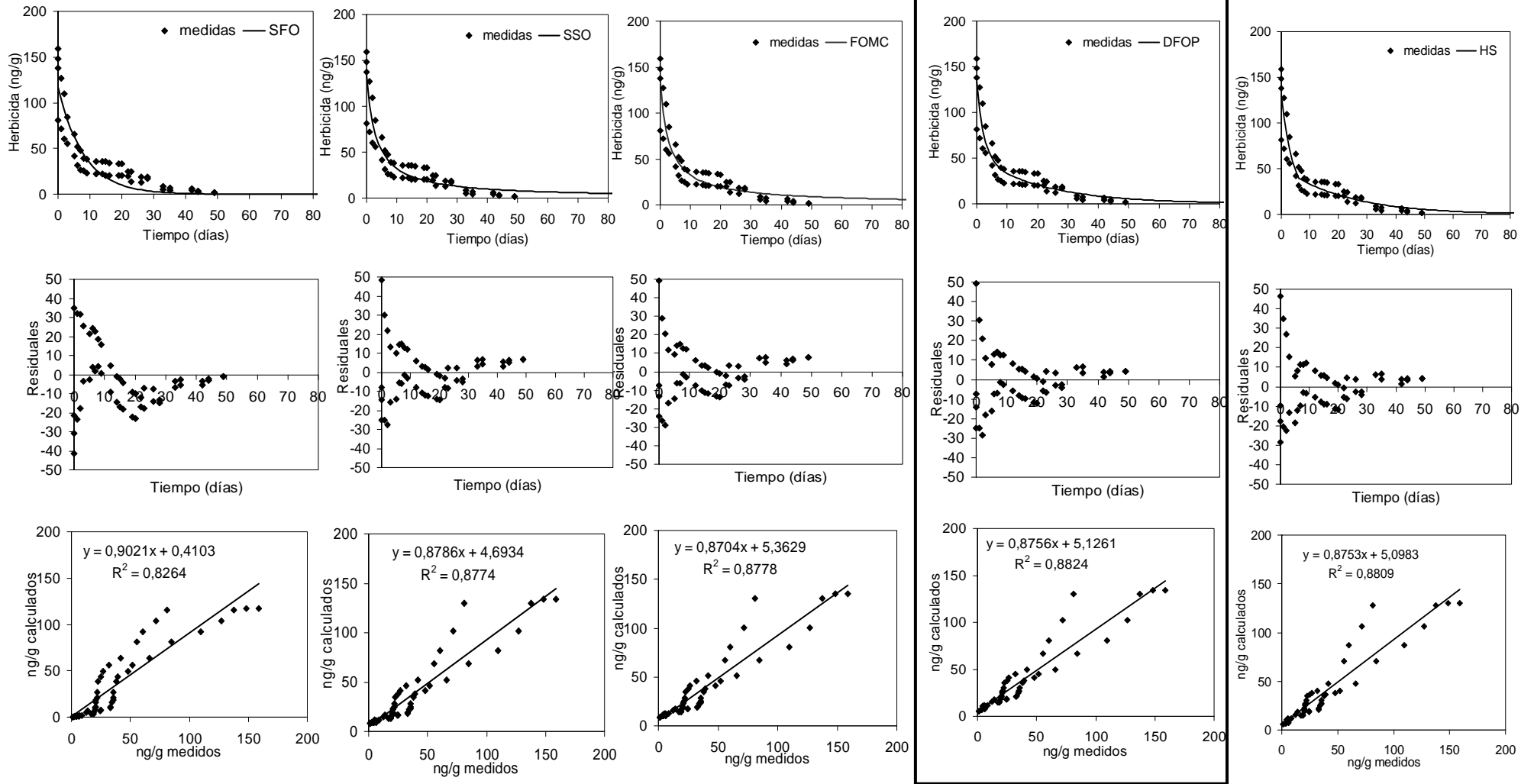


Figura 5.35. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Bromoxinil en el 3^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Ioxinil

En la Figura 5.36, se muestran los contenidos en Ioxinil obtenidos en el muestreo del ensayo en campo efectuado durante los años 2004-2005.

Su disipación siguió un patrón similar respecto del Bromoxinil del 3^{er} ensayo, produciéndose la pérdida inicial por la volatilidad de su éster octanoico. Ambos herbicidas pertenecían a la misma familia química, se usaban en condiciones climatológicas similares, y en la misma combinación, por lo que competían por los sitios de adsorción y los microorganismos que les detoxificaban.

Sus DT₅₀- DT₉₀ fueron similares a los del Bromoxinil (Tablas 5.13-5.14). La disipación del Ioxinil fue rápida, al cabo de 31 días quedaba menos del 10% de la aplicación inicial, y aunque permaneció en el suelo alrededor de un mes más que el Bromoxinil, no fue persistente, ya que después de 79 días, no se detectaba.

El Ioxinil era más lixiviable que el Bromoxinil, aunque en poca medida [95], poco volátil (Tabla 5.1), y poco susceptible a la fotólisis [96], por lo que se disipaba principalmente mediante la degradación microbiana, que aunque era débil por el bajo contenido en materia orgánica y humedad del suelo, resultaba suficiente para disipar este herbicida no persistente.

Tabla 5.14. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del Ioxinil en el 3^{er} ensayo en campo.

IOXINIL										
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS	
SFO	Mo	119,46	10,22	1,30807E-07	DT ₅₀	6,3	0,922	65,92 0,08	18,65	
	k	0,109488	0,018401		DT ₉₀	21,0	-1,95 0,98		6458,02	
SSO	Mo	131,87	8,58	1,87584E-09	DT ₅₀	4,0	0,939	53,70 0,07	13,91	
	k	0,001914	0,000268		DT ₉₀	35,7	4,55 0,91		4641,35	
FOMC	Mo	128,95	9,06		DT ₅₀	4,6	0,942	53,57 0,07	13,08	
	α	1,45	0,70		DT ₉₀	29,0	2,29 0,94		4311,97	
	β	7,48	5,49							
DFOP	Mo	128,05	6,81	0,0061302	DT ₅₀	4,6	0,943	53,06 0,07	12,82	
	g	0,70	0,23		DT ₉₀	31,0	2,33 0,94		4236,45	
	K ₁	0,226466	0,087005							
	K ₂	0,036046	0,029851		0,11658					
HS	Mo	126,48	4,04	1,16996E-17	DT _{50f}	4,9	0,946	51,80 0,07	12,05	
	tb	9,17	1,91		DT _{90f}	16,3	2,21 0,95		4017,70	
	K ₁	0,141528	0,010876		DT _{50s}	-4,3				
	K ₂	0,045048	0,013322		0,000720641	DT _{90s}	31,5			

Ioxinil

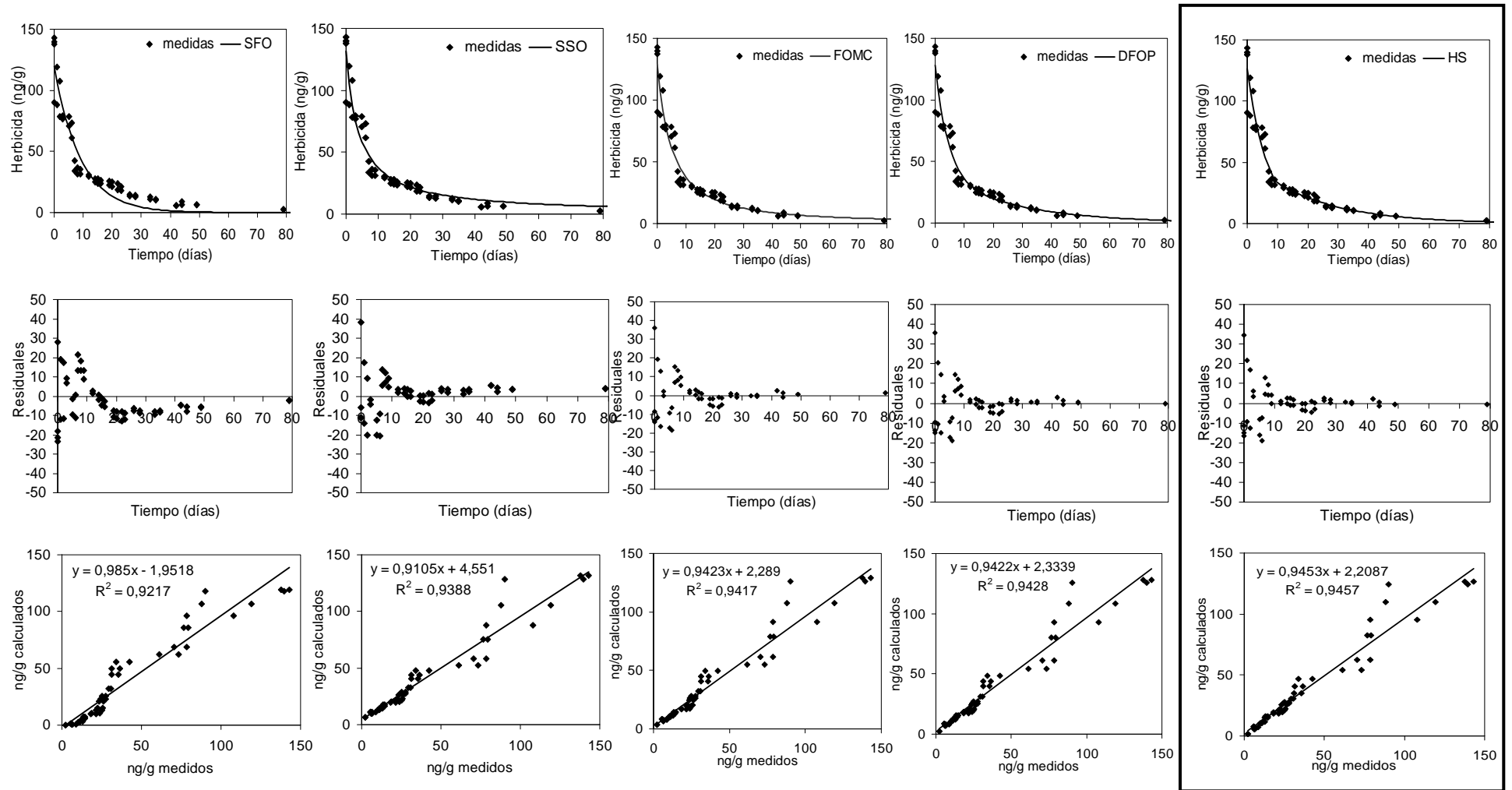


Figura 5.36. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Ioxinil en el 3^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

MCP

En principio, se considera al MCP como un herbicida móvil, poco volátil, y que por tanto, no es persistente (Tabla 5.1).

En la Figura 5.37, se muestran los contenidos en MCP obtenidos en el muestreo del ensayo en campo efectuado durante los años 2004-2005. La disipación se produjo muy rápidamente en los primeros días y luego se degradó de manera más lenta pero sin permanecer en el suelo ya que no era un herbicida persistente. Aún así, el MCP es el fenoxiácido que más persistió entre los ensayados en el campo (109 días), probablemente porque era el que se había aplicado en mayor dosis, lo que hacía que pudiera permanecer en el suelo como residuo [85].

Su degradación se produjo por vía microbiana, por lo que la cinética que mejor ajustaba los datos era la bifásica, la misma usada para otros ensayos en campo con este herbicida [98].

Su DT₅₀ fue similar al resto de fenoxiácidos, mientras que el DT₉₀ era el más bajo (Tabla 5.15). Su disipación se producía muy rápidamente, quedando menos del 10% de la aplicación inicial al cabo de 13 días, lo que concordaba con lo observado en la literatura [98-99].

Teniendo en cuenta que era el fenoxiácido menos adsorbido [97], y en vista de los resultados, se deducía que el MCP era un compuesto que se degradaba rápidamente en este suelo y resultaba algo persistente debido a que su degradación microbiana no estaba promocionada por el bajo contenido en materia orgánica y humedad del suelo.

Tabla 5.15. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del MCP en el 3^{er} ensayo en campo.

MCP										
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx	r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	721,93	88,70	0,000230898	DT ₅₀	4,4	0,958		20,46	
	k	0,159113	0,042558		DT ₉₀	14,5	-16,11	257,41	130501,28	
							1,01	0,06		
SSO	Mo	766,60	88,64	0,000332171	DT ₅₀	2,9	0,937		24,74	
	k	0,000455	0,000126		DT ₉₀	25,8	31,99	280,62	182038,78	
							0,89	0,07		
FOMC	Mo	735,55	71,48		DT ₅₀	4,0	0,956		19,84	
	α	3,78	5,74		DT ₉₀	16,5	-3,26	253,14	121029,95	
	β	19,68	34,04				0,98	0,06		
DFOP	Mo	734,28	51,50	0,0000409	DT ₅₀	4,0	0,962		17,78	
	g	0,94	0,06		DT ₉₀	16,0	6,88	229,66	100550,19	
	K ₁	0,188103	0,043850				0,96	0,05		
	K ₂	0,004514	0,021286		0,41645					
HS	Mo	729,98	24,40	1,61237E-17	DT _{50f}	4,2	0,967		16,14	
	tb	14,12	1,82		DT _{90f}	13,8	8,64	212,67	86597,04	
	K ₁	0,166691	0,013165		DT _{50s}	-85,3	0,96	0,05		
	K ₂	0,016708	0,014398		0,125699678	DT _{90s}	11,1			

MCP

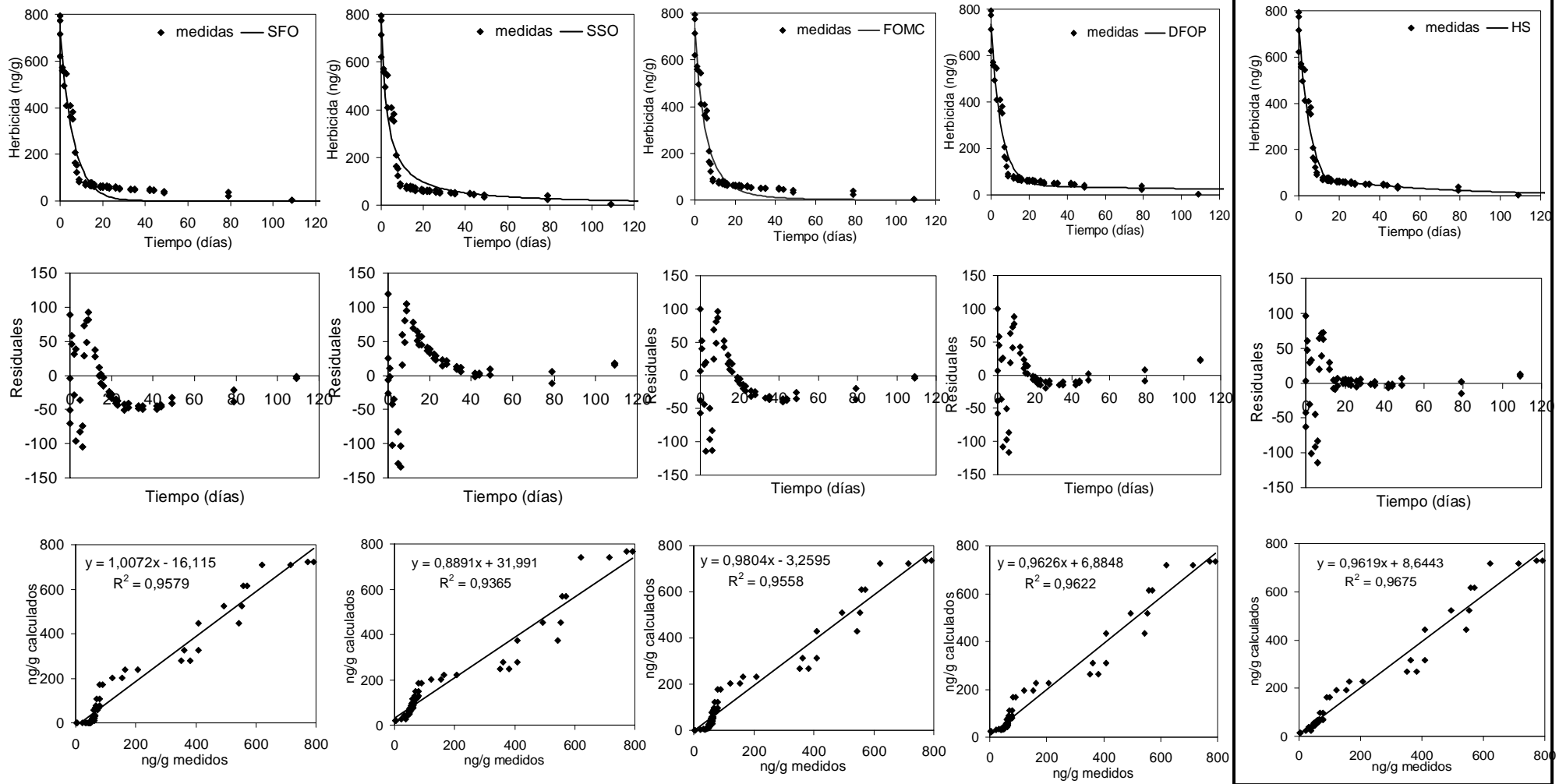


Figura 5.37. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el MCP en el 3^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

MCPA

El MCPA es un herbicida móvil, poco volátil, y por tanto, no es persistente (Tabla 5.1).

En la Figura 5.38, se muestran los contenidos en MCPA obtenidos en el muestreo del ensayo en campo efectuado durante los años 2004-2005. La disipación del herbicida siguió un patrón análogo al del MCPP, probablemente porque su estructura química era muy parecida, aunque persistió menos ya que se había aplicado en una dosis menor.

Su DT₅₀ era similar al del MCPP, pero el DT₉₀ era el doble (Tabla 5.16). Este resultado se debía probablemente a que se encontraba más adsorbido que el MCPP y, por tanto, menos disponible en la disolución del suelo para degradarse [97,100]. Su disipación resultó similar a la encontrada para algunos experimentos realizados en condiciones de campo con la sal amina del MCPA [27,93,101].

La disipación del MCPA fue rápida, al cabo de 26 días, quedaba menos del 10% de la aplicación inicial, y no fue persistente, ya que después de 79 días, no se detectaron residuos en el suelo, lo que se encontraba dentro de los valores referenciados en la literatura [75].

La degradación del MCPA en la superficie del suelo se producía como resultado de la fotodescomposición [102] y de la degradación microbiana, y disminuía rápidamente desde el primer momento de su aplicación en la superficie del suelo [27,93,101].

Tabla 5.16. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del MCPA en el 3^{er} ensayo en campo.

MCPA										
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS	
SFO	Mo	333,89	32,97	3,01982E-06	DT ₅₀	4,4	0,925	164,21	18,64	
	k	0,156257	0,030881		DT ₉₀	14,7	-10,26		49550,37	
							1,00	0,08		
SSO	Mo	362,74	33,38	5,29011E-06	DT ₅₀	2,8	0,936	139,20	11,51	
	k	0,000979	0,000200		DT ₉₀	25,3	10,45		35604,96	
							0,94	0,07		
FOMC	Mo	356,04	28,01		DT ₅₀	3,2	0,939	138,36	9,98	
	α	1,43	0,75		DT ₉₀	20,9	4,20		33242,00	
	β	5,18	4,55				0,95		0,07	
DFOP	Mo	351,27	20,60	0,0001589	DT ₅₀	3,5	0,943	133,74	8,35	
	g	0,83	0,11		DT ₉₀	22,8	5,47		31373,24	
	K ₁	0,253972	0,065453				0,94		0,07	
	K ₂	0,024485	0,025660		0,17237					
HS	Mo	346,71	11,03	5,58667E-19	DT _{50r}	3,7	0,945	131,42	7,09	
	tb	9,29	1,63		DT _{90r}	12,4	5,14		30148,04	
	K ₁	0,185146	0,013140		DT _{50s}	-19,5	0,95		0,07	
	K ₂	0,035622	0,014679		0,009519033	DT _{90s}	25,7			

MCPA

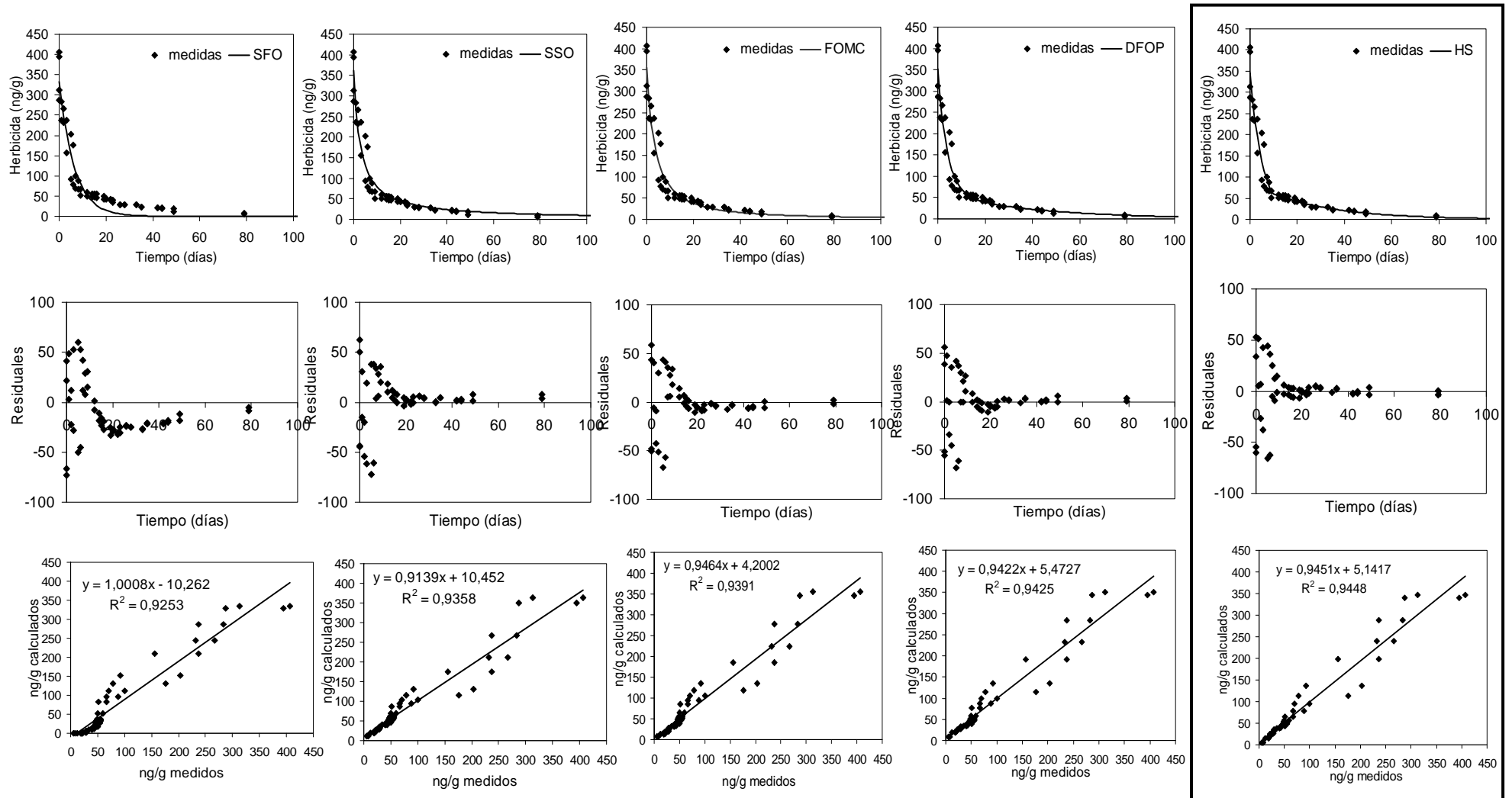


Figura 5.38. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el MCPA en el 3^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

2.4-D

Al igual que el resto de fenoxiácidos, el 2,4-D no es persistente, ya que es móvil y poco volátil (Tabla 5.1).

En la Figura 5.39, se muestran los contenidos en 2,4-D obtenidos en el muestreo del ensayo en campo efectuado durante los años 2004-2005. La disipación del herbicida fue más lenta que para los otros fenoxiácidos, con un DT₅₀ similar y con el mayor DT₉₀ (Tabla 5.17) para todos ellos, probablemente porque era el que estaba más adsorbido y, por tanto, menos disponible en la disolución del suelo para degradarse [97,100].

No se consideró necesario el tomar más muestras entre el día 49 y 79 cuando se diseñó el muestreo, puesto que los herbicidas aplicados se degradaban muy rápidamente al principio, pero en el caso del 2,4-D habría sido necesario al sufrir una degradación más lenta a lo largo del tiempo.

Su disipación era algo más lenta, y al cabo de 47 días, quedaba menos del 10% de la aplicación inicial. No fue persistente, ya que después de 79 días, no se detectaron residuos en el suelo, lo que se encontraba dentro de algunos valores encontrados en la literatura [75], resultando algo superior frente a los 20 días de disipación de otros estudios en suelos agrícolas [103].

La degradación del 2,4-D en la superficie del suelo se producía de manera similar a la del MCPA, como resultado de la fotodescomposición [102] y de la degradación microbiana, y disminuía rápidamente desde que se aplicaba en la superficie del suelo [27,93,103] no sufriendo lixiviación pese a ser soluble en agua.

Tabla 5.17. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del 2,4-D en el 3^{er} ensayo en campo.

2,4-D									
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx	r ²	± (intv a / intv b)	chi / RSS	
SFO	Mo	321,32	33,58	5,79041E-06	DT ₅₀	7,8	0,852	24,38	
	k	0,089237	0,018319		DT ₉₀	25,8	-5,32	261,34	89190,08
							0,96	0,12	
SSO	Mo	375,60	37,03	4,89189E-06	DT ₅₀	4,3	0,941	9,69	
	k	0,000618	0,000126		DT ₉₀	38,8	-1,17	164,18	31984,36
							0,98	0,07	
FOMC	Mo	390,94	33,11		DT ₅₀	3,4	0,950	6,93	
	α	0,67	0,20		DT ₉₀	56,3	6,82	144,16	26061,42
	β	1,83	1,34				0,95	0,06	
DFOP	Mo	385,92	24,72	0,0011795	DT ₅₀	3,4	0,953	5,23	
	g	0,64	0,09		DT ₉₀	47,1	6,28	139,55	24273,97
	K ₁	0,392986	0,122372				0,95	0,06	
	K ₂	0,027275	0,011566		0,01124				
HS	Mo	373,59	11,95	1,53843E-14	DT _{50f}	3,9	0,948	7,22	
	tb	6,31	0,81		DT _{90f}	13,0	6,30	147,23	27043,81
	K ₁	0,177268	0,016642		DT _{50s}	-8,4	0,95	0,06	
	K ₂	0,028955	0,005248		6,778E-07	DT _{90s}	47,2		

2,4-D

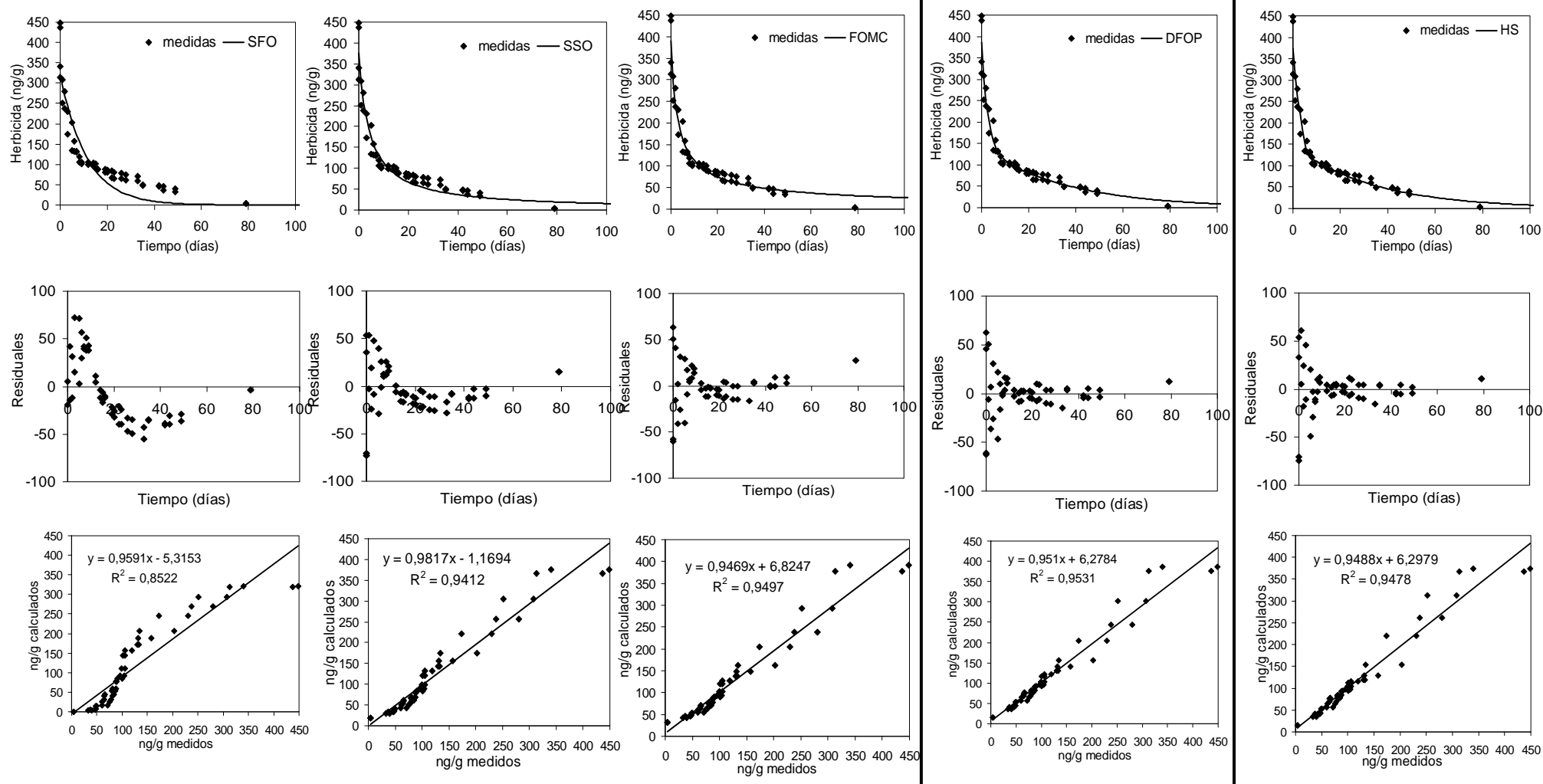


Figura 5.39. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuos (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el 2,4-D en el 3^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Dicamba

El Dicamba está considerado como un herbicida muy móvil, ya que su coeficiente de reparto es muy pequeño, tiene baja volatilidad, y por tanto, no es persistente (Tabla 5.1). Sin embargo, su movilidad es variable dependiendo de las condiciones y el suelo en el que se aplique [68], siendo muy elevada en algunos ensayos [104], mientras que en otros apenas se lixivia [69]. En este ensayo en campo sólo se muestreó la parte superficial, pero, debido a que no se encontraron pérdidas importantes respecto de la cantidad inicial, con recuperaciones análogas a las de otros estudios [105], y a que sufrió un proceso de degradación similar al del resto de fenoxiácidos, se dedujo que en este suelo no era demasiado móvil probablemente por su escasa humedad que limitaba su lixiviación.

En la Figura 5.40, se muestran los contenidos en Dicamba obtenidos en el muestreo del ensayo en campo efectuado durante los años 2004-2005. La desaparición del herbicida siguió un patrón similar al resto de fenoxiácidos, aunque no se degradaba tan rápidamente como el MCPA o el MCPP, y su disipación era más parecida a la del 2,4-D. Su DT₅₀ (Tabla 5.18) similar al resto de fenoxiácidos, entraba dentro de la literatura [106], aunque era algo inferior a otros valores descritos, en función del rango de aplicación [62].

La disipación del Dicamba fue de las más rápidas, al cabo de 21 días, quedaba menos del 10% de la aplicación inicial, y resultó ser el menos persistente de todos los fenoxiácidos estudiados, ya que después de 49 días no se detectaba.

Por su naturaleza ácida, se adsorbía muy débilmente en la materia orgánica del suelo [103], lo cual explicaba su escasa permanencia en este tipo de suelos. Un estudio con columnas de suelo inalterado concluyó que la persistencia del Dicamba en suelos agrícolas era altamente variable y dependía de una serie de factores como el rango de aplicación, el contenido en humedad, la temperatura, el pH y el tipo de suelo [62].

Tabla 5.18. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del Dicamba en el 3^{er} ensayo en campo.

DICAMBA									
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS
SFO	Mo	178,53	14,90	1,09828E-07	DT ₅₀	5,0	0,906	101,31 0,09	20,71
	k	0,139432	0,023094		DT ₉₀	16,5	-0,41		16613,21
SSO	Mo	192,08	14,33	1,0095E-07	DT ₅₀	3,2	0,892	96,39 0,09	23,25
	k	0,001631	0,000269		DT ₉₀	28,7	11,17		18855,66
FOMC	Mo	183,56	12,24		DT ₅₀	4,4	0,907	95,93 0,09	19,82
	α	3,13	2,97		DT ₉₀	19,1	3,49		15622,13
	β	17,60	21,26				0,92		
DFOP	Mo	182,18	9,39	0,0000113	DT ₅₀	4,5	0,910	93,14 0,09	18,99
	g	0,94	0,10		DT ₉₀	18,3	4,69		14989,87
	K ₁	0,166731	0,035351				0,91		
	K ₂	0,002133	0,033688		0,47489				
HS	Mo	181,54	7,13	3,35406E-15	DT _{50f}	4,6	0,913	91,73 0,08	18,45
	tb	13,58	2,84		DT _{90f}	15,3	5,00		14608,13
	K ₁	0,150057	0,013249		DT _{50s}	-24,9	0,91		
	K ₂	0,034986	0,024309		0,078425058	DT _{90s}	21,2		

Dicamba

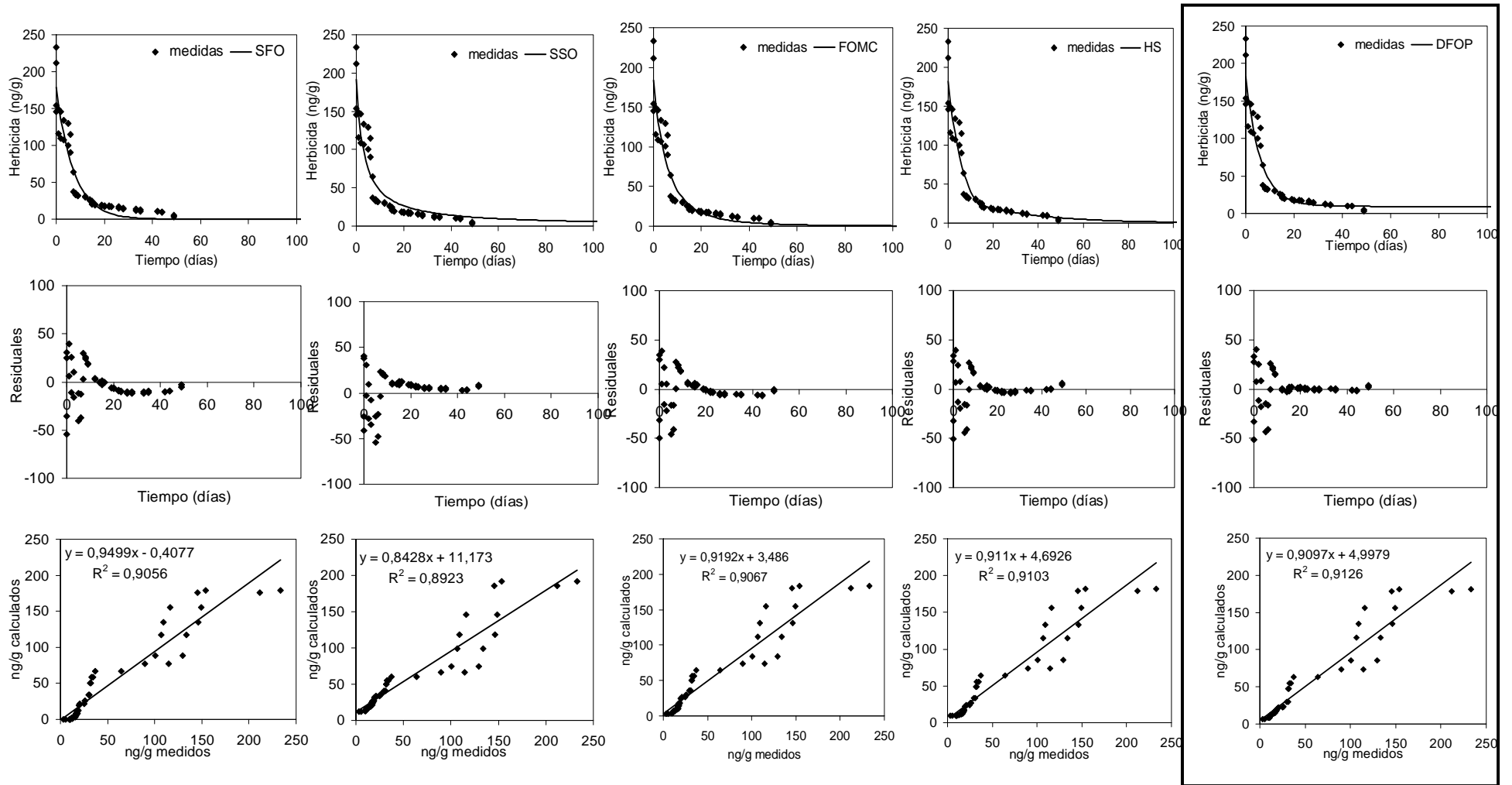


Figura 5.40. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Dicamba en el 3^{er} ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

Diclofop

El Diclofop tiene poca movilidad, una volatilidad media, y una alta adsorción en el suelo, lo que hace que sea más persistente que los fenoxiácidos (Tabla 5.1).

Se ha comprobado que la hidrólisis del éster aplicado al suelo a su correspondiente ácido es mucho mayor en el caso de suelos básicos, lo que justificaba el hecho de que prácticamente no se encontraran residuos del Diclofop metil en este ensayo en campo en particular [107].

En la Figura 5.41, se muestran los contenidos en Diclofop obtenidos en el muestreo del ensayo en campo efectuado durante los años 2004-2005. Las curvas de disipación mostraron una pérdida inicial rápida seguida de otra mucho más lenta, análogamente a lo encontrado en la bibliografía [107].

Su DT₅₀ fue el más alto de todos los herbicidas en este ensayo (Tabla 5.19), y su DT₉₀ era similar al del 2,4-D, el más alto para los fenoxiácidos, entrando ambos valores dentro del rango observado en la literatura [83]. Su disipación fue relativamente rápida, aunque más lenta que para los fenoxiácidos, sobre todo en los primeros días del ensayo, quedando menos del 10% de la aplicación inicial después de 41 días. Sin embargo, fue muy persistente, ya que hasta después de 288 días, se siguió detectando.

En vista de los resultados, se deducía que el Diclofop era un herbicida que sufría una degradación rápida al principio en este suelo, pero resultaba persistente debido a que su degradación microbiana no estaba favorecida por el bajo contenido en materia orgánica del suelo, a pesar de la presencia del cultivo, que ayudaba a incrementar la presencia de microorganismos en estudios similares [82].

Tabla 5.19. Parámetros optimizados de las 5 cinéticas estudiadas para la disipación del Diclofop en el 3^{er} ensayo en campo.

DICLOFOP											
Modelo	Parám.	Valor optimizado	Error standard	test t	DTx		r ² a / b	± (intv a / intv b)	chi / RSS		
SFO	Mo	313,06	33,48	2,85579E-05	DT ₅₀	14,7	0,948	161,87	10,15		
	k	0,047209	0,010839		DT ₉₀	48,8				6,84	31325,85
SSO	Mo	331,62	36,74	3,97392E-05	DT ₅₀	11,4	0,918	183,82	15,61		
	k	0,000264	0,00		DT ₉₀	102,9				26,34	54314,19
FOMC	Mo	312,79	27,53		DT ₅₀	14,7	0,948	161,68	31188,18		
	α	11378,88	13527,50		DT ₉₀	49,0				7,18	
	β	242040,15	285503,00							0,95	0,06
DFOP	Mo	310,77	19,73	0,0320511	DT ₅₀	15,1	0,950	161,71	9,98		
	g	5,91	0,35		DT ₉₀	46,2				4,96	30692,88
	K ₁	0,034020	0,017998							0,96	0,06
	K ₂	0,031842	0,001595		6,78662E-27						
HS	Mo	301,54	8,50	3,08979E-12	DT _{50f}	18,4	0,958	150,68	8,56		
	tb	15,00	2,51		DT _{90f}	61,2			0,76	26207,76	
	K ₁	0,037602	0,004297		DT _{50s}	16,9			0,98	0,06	
	K ₂	0,066965	0,008254		3,24287E-11	DT _{90s}			41,0		

Diclofop

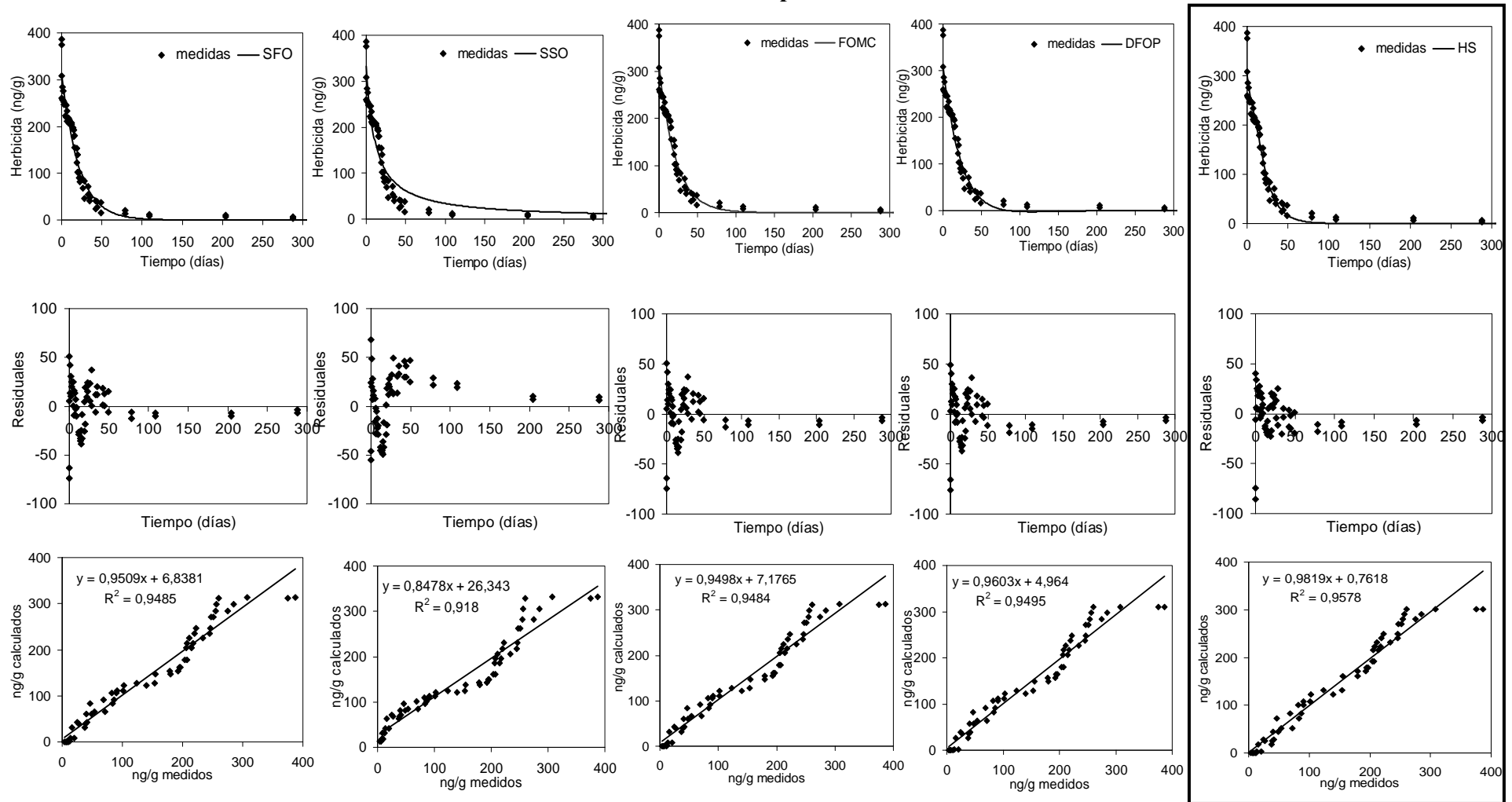


Figura 5.41. Ajuste de los datos (1ª línea), gráfico de residuales (2ª línea), y representación de los valores calculados en función de los observados (3ª línea), mediante las 5 cinéticas estudiadas para el Diclofop en el 3er ensayo en campo. Se ha enmarcado la cinética que mejor ajusta los datos experimentales.

5.3.2. RESIDUOS EN CEBADA

Por último se estudió la presencia de residuos en muestras de cebada tomadas durante la cosecha, para conocer si estos herbicidas se almacenaban en las plantas pudiendo constituir un riesgo para la salud humana y animal, tomando como criterio que los resultados obtenidos fueran menores a los correspondientes LMRs en cebada (Tabla 4.9).

Las muestras se tomaron en cada línea del ensayo, muestreando cada réplica por separado. En el laboratorio se separó el grano de la paja, llevando a cabo la extracción de manera diferente, según lo indicado en el Capítulo 4.

Se obtuvieron resultados negativos en todas las muestras de grano y paja, no detectándose ninguno de los herbicidas aplicados en el campo.

Hay que tener en cuenta que la cosecha se produjo a los 56, 85 y 49 días (Tabla 5.5), después de la aplicación de los tratamientos en el 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} ensayo, respectivamente. El 2^{do} ensayo se muestreó más tarde ya que los tratamientos se hicieron casi un mes antes que en los otros dos años. Se ha comprobado mediante el ajuste de las cinéticas de disipación en suelos, que en esos días se había disipado más del 90% del producto inicialmente aplicado para todos los herbicidas, excepto para el Flamprop, que se disipaba más lentamente. Por otra parte, estos resultados podrían indicar que esta disipación no era resultado de la absorción de los herbicidas por las plantas ya que no se encontraban residuos almacenados en ellas.

Sin embargo, con el estudio aquí realizado no podría asegurarse que no exista un riesgo potencial para la nutrición humana y animal. Únicamente indicaría que aunque los herbicidas hayan podido adsorberse por las raíces del cereal, o incluso por sus tallos y hojas, éste ha sido capaz de metabolizarlos, y eliminarlos por transpiración. En esto se basa la selectividad del cereal a estos compuestos.

En estudios similares llevados a cabo con Terbutrina y Trialato en macetas y contenedores con suelo agrícola donde se sembró cebada, no se detectaron residuos de ningún herbicida en el grano y la paja después de la recolección [33], mientras que en otros se detectaron residuos de Trialato en muestras de cebada [34]. Los estudios que se han realizado se llevaron a cabo en condiciones reales de campo, donde actuaban muchos más procesos que aceleraban la disipación de los herbicidas. El suelo para los estudios en macetas y contenedores suele prepararse, de manera que la actividad microbiana disminuye por la ausencia de nutrientes, lo que podría haber causado su acumulación en las plantas de cebada, mientras que en el campo se produciría la degradación de los residuos antes de la cosecha.

5.4. CONCLUSIONES

1. Las cinéticas de orden 1 y 2 no ajustan bien los datos de disipación de los herbicidas en el campo, ya que, en general, la primera ignora los residuos que permanecen en el suelo, mientras que la segunda los magnifica. Son las cinéticas bifásicas, DFOP y HS, las que los predicen mejor, estimación ésta muy importante, ya que determina el posible riesgo medioambiental. El comportamiento bifásico es típico de los ensayos en campo debido a que la fracción de herbicida disponible disminuye con el tiempo al hacerse más lentos la adsorción y los procesos de difusión, o por la dependencia del proceso de degradación con la disminución de la actividad microbiana, lo que provoca que a una disipación inicial rápida le siga una disminución sustancial.
2. A la vista de la representación de los datos frente al tiempo se deduce que los herbicidas estudiados sufren primero un periodo de disipación, producido por una degradación rápida llevada a cabo por procesos físico-químicos (fotólisis, principalmente), seguida por un periodo de persistencia, en el que la degradación es más lenta ya que está producida por procesos biológicos, principalmente de degradación microbiana. Este comportamiento, descrito mediante modelos bifásicos, considera que el suelo está formado por dos compartimentos diferentes, uno de degradación rápida y otro más lenta, cada uno afectado por una cinética de orden 1, en los que, o bien el herbicida se divide una vez aplicado, como en el modelo DFOP, o bien el herbicida se transfiere de uno a otro a lo largo del tiempo, como en el modelo HS.
3. En general para todos los herbicidas del estudio, los tests estadísticos de bondad de ajuste muestran una mayor eficiencia de simulación de la cinética DFOP o HS, frente a las otras 3 (SFO, SSO, FOMC), ya que presentan una distribución más aleatoria de residuales y de los puntos a lo largo de la recta de los valores calculados frente a los observados, un valor de pendiente más cercano a 1, un intercepto que incluye al cero, y un valor del error de chi inferior al 20%.
4. Los valores de DT_{50} y DT_{90} hallados son, en general, inferiores a los publicados (Tabla 5.1), debido a que la disipación es siempre mayor en el campo, ya que hay más posibilidades para la volatilización, la lixiviación, la fotólisis y el envejecimiento que en los estudios en laboratorio. Sin embargo, la persistencia de algunos herbicidas es elevada, sobre todo para los herbicidas neutros, debido probablemente a las condiciones climáticas en que se ha llevado a cabo el ensayo, con altas temperaturas y escasas precipitaciones en verano, y al tipo de suelo característico de esta zona.
5. Se comprueba que el método multiresiduo de extracción y análisis en muestras de suelo optimizado y validado es adecuado para las muestras generadas a lo largo de los ensayos de disipación en campo, ya que es capaz, en general, de determinar residuos equivalentes al menos del 5% de la cantidad de herbicida inicialmente aplicada en el suelo.
6. Los años en que se realizan los ensayos son de escasas precipitaciones, con una media de 500 mm. Los tratamientos se producen en abril, y los meses siguientes son calurosos y con escasas precipitaciones, lo que provoca la rápida disipación de todos los herbicidas, debido principalmente a procesos influidos por la temperatura, como la fotólisis o la volatilización, incrementados por la baja adsorción de los herbicidas en este suelo al contener escasos coloides. Sin embargo, aquellos herbicidas que son persistentes, mantienen cantidades residuales durante mucho más tiempo debido a que, la baja humedad y escasa materia orgánica, no favorecen los procesos de degradación microbiológicos, muy importantes en la disipación lenta de los

herbicidas. Esto explica la elevada persistencia del Trialato, que permanece hasta después de 480 días, y el elevado valor de DT₉₀ para el Flamprop (155-129 días) que se encuentra en el 1^{er} y 2^{do} ensayo.

7. No se registran unas condiciones climatológicas muy diferentes entre el 1^{er} y 2^{do} ensayo, apreciándose una temperatura media ligeramente inferior y mayores precipitaciones al inicio del 2^{do} ya que el 1^{er} ensayo se lleva a cabo casi un mes después. De hecho, el Trialato, la Pendimetalina, y el Flamprop, muestran el mismo patrón de degradación fuerte durante los dos ensayos, por su elevada volatilización en el suelo del ensayo, con mucha arena y pocos coloides, pero son persistentes por su limitada solubilidad, poca movilidad, y adsorción debida a la baja humedad. El Isoproturon y la Terbutrina, sin embargo, se ven afectados por las condiciones meteorológicas y se degradan más rápidamente en el 2^{do} ensayo porque llueve más después de realizar el tratamiento. Su persistencia es moderada porque la baja humedad no favorece la degradación microbiana, aunque no están demasiado adsorbidos. La Terbutrina se degrada más lentamente que el Isoproturon, lo que se comprueba al ser mayores sus DT₉₀.
8. En el 3^{er} ensayo se observa que aquellos herbicidas que se aplican en forma de ésteres sufren mayores pérdidas en el primer día de tratamiento respecto de los que se aplican en forma de sales, ya que éstas no son volátiles y permanece en el suelo, a diferencia de los ésteres volátiles. El mayor problema que presentan las sales es su potencial lixiviación, fenómeno que no se produjo al registrarse muy pocas precipitaciones en el primer mes. Después de 24 h desde el tratamiento, los ésteres y las sales se hidrolizan a sus correspondientes ácidos y fenoles no volátiles, permaneciendo en el suelo, susceptibles de degradarse.
9. En general, los herbicidas aplicados en el 3^{er} ensayo no son persistentes, y se degradan totalmente durante el verano, permaneciendo algo más el MCP, debido a que se aplica en la dosis más alta. La única excepción es el Diclofop, ya que en las condiciones de este suelo no se favorecen los procesos de degradación microbiológicos, lo que aumenta su persistencia. Se aprecia en el caso del Bromoxinil, una menor degradación en el 3^{er} ensayo, probablemente al haberse aplicado en combinación con otros herbicidas que competirían por los sitios de adsorción e incluso por los microorganismos que pudieran detoxificarlos, a diferencia de en el 1^{er} ensayo en el que se aplicó individualmente.
10. No se presentan datos para el Fenoxaprop p etil y el Mefenpir dietil porque no se pueden estudiar las cinéticas de disipación ya que, al ser su proporción en el producto comercial muy baja, solamente se detectan en los primeros días del ensayo, obteniéndose muy pocos puntos para un ajuste adecuado de los modelos.
11. Los herbicidas Trialato, Flamprop, Pendimetalina, Terbutrina e Isoproturon resultan muy persistentes en las condiciones agronómicas de uso y aplicación, y los riesgos de contaminación por acumulación de los herbicidas en los suelos de las estepas cerealistas pueden ser importantes. Sin embargo los fenoxiácidos, muy usados para malas hierbas de hoja ancha en esta zona, se disipan adecuadamente sin dejar residuos en el suelo en el momento de la cosecha.
12. Se obtienen resultados negativos en todas las muestras de grano y paja, no detectándose ninguno de los herbicidas aplicados en el campo. Hay que tener en cuenta que el muestreo de la cebada se produjo a los 56, 85 y 49 días (Tabla 5.7), después de la aplicación de los tratamientos en el 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} ensayo, respectivamente, cuando ya se había disipado más del 90% del producto

inicialmente aplicado para todos los herbicidas. Esta disipación no es, por tanto, resultado de la absorción de los herbicidas por las plantas, ya que no se encuentran residuos almacenados en ellas.

13. Sin embargo, con el estudio aquí realizado no puede asegurarse que no exista un riesgo potencial para la nutrición humana y animal. Esto indicaría que aunque los herbicidas hayan podido adsorberse por las raíces del cereal, o incluso por sus tallos y hojas, éste ha sido capaz de metabolizarlos, y eliminarlos por transpiración.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

1. “Working Document Guidance Document on Persistence in Soil”. Dirección General de Agricultura. Comisión Europea. 2007.
2. M. Alexander. “Biodegradation and bioremediation”. Academia Press. San Diego, CA. 1994.
3. S. Rousseau, A. Hartmann, G. Soulas. “Etudes de souches isolées dégradant l’atrazine”. Actes du 30ème congrès du groupe français des pesticides. 2001.
4. H.H. Cheng. “Pesticides in the Soil environment: processes, impacts and modelling”. Soil Science Society of America, Inc. Madison, USA. 1990.
5. C.S. Helling, P.C. Kearney, M. Alexander. *Adv. Agron.* 23 (1971) 147.
6. R. Calvet. “Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils”. En “Methodological aspects of the study of pesticide behaviour in soil”. P. Jamet P (Ed.). INRA, Paris. 1989.
7. J. Cornejo, P. Jamet (Eds.) “Pesticide/soil interactions: some current research methods”. INRA, Paris. 2000.
8. E. Barriuso, P. Benoît. “State-of-the-art review on bound residues”. Report DL5 of the FP6 EU-funded FOOTPRINT project. 2006.
9. D.I. Gustafson. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 (1989) 339.
10. “The FOOTPRINT Pesticide Properties DataBase”. Database collated by the University of Hertfordshire as part of the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704). 2006.
11. “Assessing soil contamination, A reference manual”. FAO, Roma. 2000.
12. D. Pike. “Environmental Toxicities and Properties of Common Herbicides”. Department of Crop Sciences. Universidad de Illinois. 2000.
13. R.D. Wauchope. *Weed Technol.* 6 (1992) 753.
14. K.M. Spark, R.S. Swift. *Sci. Total Environ.* 298 (2002) 147.
15. S. Guimont. “Devenir des plaguicides dans les soils en fonction de l’état d’humidité et du mode de circulation de l’eau dans le sol”. Tesis Doctoral. Instituto Nacional Polytechnico de Lorraine. Francia. 2005.
16. J.W. Hamaker, J.M. Thompson. “Adsorption”. In: “Organic Chemicals in the Soil Environment”. C.A.J. Goring, J.W. Hamker (Eds.). Marcel Dekker, New York. 1972.
17. G. Singh. *Environ. Pollut.* 66 (1990) 253.
18. N. Hesketh, M.N. Jonesa, E. Tipping. *Anal. Chim. Acta* 327 (1996) 191.
19. I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Roses. *Anal. Chem.* 72 (2000) 1802.
20. S. Navarro Blaya. “Dinámica de los plaguicidas en el suelo”. En “Plaguicidas en Suelos”. Serie: Monografía del Medio Ambiente nº4. J. Cornejo, JL Pérez Rodríguez (Eds.). Agencia del Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla. 1986.
21. C.T. Chiou, T.D. Shoup. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1985) 4.
22. K.M. Scow. *SSSA Special Publication* 32 (1993) 73.

23. G.A. O'Connor, P.J. Wierenga, H.H. Cheng, K.G. Doxtader. *Soil Sci.* 130 (1980) 157.
24. J.D. O'Dell, J.D. Wolt, P.M. Jardine. *Soil Sci. Soc. Ame. J.* 56 (1992) 1711.
25. I. Porro, P.J. Wierenga. *Groundwater*, 31 (1993) 193.
26. G.F. Czapar, R. Horton, R.S. Fawcett. *J. Environ. Qual.* 21 (1) (1992) 110.
27. M.A. Crespin, M. Gallego, M. Valcarcel, J.L. Gonzalez. *Environ. Sci. Technol.* 35 (21) (2001) 4265.
28. M.J. Calderón, M.C. Hermosín, J. Cornejo, F. Moreno. "Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación". En "Estudios en la Zona no Saturada del Suelo". R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón (Eds.). ICIA, Tenerife. 1999.
29. O. Price. "Spatial Variation in Pesticide/Soil interactions at field scale". Tesis Doctoral. University of Reading, Reino Unido. 2002.
30. D. García-Sinovas. "Estudio a diferentes Escalas del Comportamiento de Formas Nitrogenadas y tres Herbicidas en Suelos". Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid. ITACyL. Junta de Castilla y León. 2006.
31. M.Th.Van Genuchten, J.M. Davidson, P.J. Wierenga. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 38 (1974) 29.
32. L. Guo, T.J. Bicki, A.S. Felsot, T.D. Hinesly. *J. Environ. Qual.* 22 (1993) 186.
33. M.T. Tabernero. "Comportamiento de Herbicidas en Suelos de Uso Agrícola: Volatilización y Degradación". Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. S.I.D.T.A. de la Junta de Castilla y León. 1998.
34. A. Herguedas. "Residuos de Tratamientos con herbicidas en Suelos de Uso Agrícola". Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid. S.I.D.T.A. de la Junta de Castilla y León. 1996.
35. S. Beulke, I.G. Dubus, C.D. Brown. *J Environ. Qual.* 29 (5) (2000) 1371.
36. H.J. Di, L.A.G. Aylmore, R.S. Kookana. *Soil Sci.* 163 (1998) 404.
37. B. Doncel, E. Dorn. *Pure Appl. Chem.* 64 (12) (1992) 1965.
38. K.D. Racke, M. W. Skidmore, D.J. Hamilton, J.B. Unsworth, J. Miyamoto, S.Z. Cohen. *Pure Appl. Chem.* 69 (6) (1997) 1349.
39. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. "Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides". 1995.
40. Environmental risk assessment scheme for plant protection products, PP3, EPPO Standards, European Plant Protection Organization (1993).
41. OPPTS Residue Chemistry, Test Guidelines, Series 860. EPA.
42. M. Corbin, W. Eckel, M. Ruhman, D. Spatz, N. Thurman. "Guidance Document for Conducting Terrestrial Field Dissipation Studies". Technical Working Group on Pesticides. North American Free Trade Agreement. 2006.
43. "Harmonization of Guidance for Terrestrial Field Studies of Pesticide Dissipation under the North American Free Trade Agreement". Pest Management Regulatory Agency. Canada. 2006.

44. "Guidelines for testing of chemicals". Organisation for Economic Co-operation and Development. 1993.
45. "Recommended sampling methods for supervised field trials. Appendix V". En "Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed". FAO, Roma. 2002.
46. "Revised guidelines on environmental criteria for registration of pesticides". FAO, Roma. 1981.
47. "Environmental criteria for the registration of pesticides". GIFAP Technical Monograph. Bruselas. 1990.
48. H. Esser, R.J. Hemingway, W. Klein, D.B. Sharp, J.W. Vonk, P.T. Holland. "Recommended approach to the evaluation of the environmental behaviour of pesticides". Pure Appl. Chem. 60 (1988) 901.
49. W.A. Jury, H. Flürer. Adv. Agron. 47 (1992) 141.
50. P.M. Jardine, F.M. Dunnivat, H.M. Selim, M. McCarth. Soil Sci. Soc. Am. J. 5 (1992) 393.
51. M. T. van Genuchten, R.W. Cleary. "Soil chemistry. B. Physico-chemical models. Developments in soil science". Elsevier scientific publishing company. 1982.
52. "Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration". Report of the FOCUS work group on degradation kinetics. EC Document Reference SANCO/10058/2005 version 2.0. 2006.
53. G.P. Hill, J.W. McGahen, H.M. Baker, D.W. Finnerty, C.W. Bingeman. Agron. J. 47 (1955) 93.
54. G. Timme, H. Frehse, V. Laska. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 39 (1986) 187.
55. J.P.E. Anderson. "Handling and storage of soils for pesticide experiments". En "Pesticide Effects on Soil Microflora". L. Somerville, M.P. Greaves (Eds). Taylor & Francis. London, New York, Philadelphia. 1987.
56. J.J. Pignatello. Adv. Agron. 69 (2000) 1.
57. D.I. Gustafson, L.R. Holden. Environ. Sci. Technol. 24 (1990) 1032.
58. O. Richter, P. Nörtershäuser, B. Dieckkrüger. "Environmental Fate Modelling of Pesticides. From the Laboratory to the Field Scale". VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim. 1996.
59. P.M. Jardine, F.M. Dunnivat, H.M. Selim, M. McCarth. Soil Sci. Soc. Am. J. 5 (1992) 393.
60. G.K. Vasilyava, I.N. Gogotov, E.G. Surovtseva. "Adaptation of microorganisms for pesticide degradation". En "Fate of pesticides & chemicals in the environment". J.L. Schnoor (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. 1991.
61. T. Isla. "Caracterización y Modelización de la Adsorción y Transporte de tres herbicidas en Suelos". Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid. S.I.D.T.A. de la Junta de Castilla y León. 1999.

62. M.V. Cuevas. "Persistencia y Procesos que afectan a Herbicidas empleados en el Valle del Guadalquivir. Validación del Modelo MACRO". Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. CSIC. 2004.
63. J.L. Villarías. *Terralia* 12 (2000) 12.
64. C. Fernández Quintanilla. "Buenas prácticas agrícolas el control de malas hierbas en los cereales de invierno". En "Control integrado de las malas hierbas". Phytoma. 1999.
65. C. de Liñán. "Vademécum". Ed. Agrotécnicas S.L. Madrid. 2002.
66. J.J. Guitián. "Registro de Productos Fitosanitarios". Departamento de Pesticidas. Subdirección General de Medios de Producción Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2002-2008.
67. A. Hager, C. Sprague, M. McGlamery. "Application equipment and calibration references". En "Illinois agricultural pest management handbook". Department of Crop Sciences. Universidad de Illinois. 2000.
68. R.S. Oliveira, W.C. Koskinen, F.A. Ferreira. *Weed Res.* 41 (2) (2001) 97.
69. W.C. Koskinen, B.A. Sorenson, D.D. Buhler, D.L. Wyse, E.A. Strand, W.E. Lueschen, M.D. Jorgenson, H.H. Cheng. *Lysimeter concept* 699 (1998) 115.
70. Gómez de Barreda. "Características f^a-q^a-b^as que definen el comportamiento en el suelo de los fitosanitarios". Sociedad Española de Malherbología. 1998.
71. W.H. Press, S.A. Teukolky, W.T. Vettering, B.P. Flannery. "Numerical recipes in C. The Art of Scientific Computing". Cambridge University Press. New York. 1992.
72. R.L. Zimdahl, B.K. Cranmer, W.W. Stroup. *Weed Sci.* 42 (2) (1994) 241.
73. "Mapa Geológico de España". IGME, Instituto Geológico Minero Español. 1980.
74. J. Sanz-Zuasti, J. García, C. Sánchez. "Las aves esteparias en Castilla y León. Distribución, población y tendencia". Consejería de Medio Ambiente. Junta de Castilla y León. 2006.
75. A. Hager, C. Sprague, M. McGlamery. "Factors Affecting Herbicide Persistence". En "Illinois Agricultural Pest Management Handbook". Department of Crop Sciences. Universidad de Illinois. 2000.
76. A. Lagana, G. Fago, A. Marino. *Anal. Chem.* 70 (1) (1998) 121.
77. A. Walker, P.H. Nicholls, A.A. Evans, V.J.R. Smith. *Weed Res.* 42 (1) (2002) 39.
78. E.W. Gatzweiler, B. Schimdt, D.M. Feyerabend, R.L. Jones, D.J. Arnold. "Isoproturon - Field Studies on the Behaviour in fine-textured soils". XI Symposium Pesticide Chemistry. Cremona, Italia. 1999.
79. J. Tekel, J. Kovacicová. *J. Chromatogr. A* 643 (1993) 291.
80. E. Primo Yúfera, J.M. Carrasco Dorrien. "Química Agrícola II: Plaguicidas y Fitorreguladores". Editorial Alhambra. 1977.
81. U. Trauberberhard, W. Kordel, W. Klein. *Chemosphere* 28 (2) (1994) 273.
82. S. Piutti, B. Lagacherie, F. Martin-Laurent, G. Soulas, I. Soulas. *Pes. Manag. Sci.* 58 (3) (2002) 303.

83. J.J. Miller, C. Chang, C.W. Lindwall. *Can. J. Soil Sci.* 75 (3) (1995) 349.
84. C.G. Zambonin, F. Palmisano. *J. Chromatogr. A* 874 (2) (2000) 247.
85. C. Sánchez-Brunete. “Análisis de formulaciones y residuos de herbicidas en cereales de invierno”. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1993.
86. M. Strandberg, J.J. Scott-Fordsmand. *Ecotox. Environ. Safe.* 57 (2) (2004) 190.
87. E. Leitis, D.G. Crosby. *J. Agr. Food Chem.* 22 (1974) 842.
88. A.E. Smith, T.C. McIntosh, A.E. Smith. *J. Agr. Food Chem.* 43 (11) (1995) 2988.
89. J.B. Belden, K.L. Henderson, B.W. Clark, M.J. Lydy, J.R. Coats. “Environmental fate and effects of pesticides”. ACS Symposium Series 853 (2003) 167.
90. B.S. Ismail. *Trop. Agr.* 76 (4) (1999) 241.
91. A. Zertal M. Jacquet, B. Lavedrine, T. Sehili. *Chemosphere* 58 (2005) 1431.
92. R. K. Zollinger. “Weed Control Guide”. NDSU Extension Weed Specialist. Universidad de Dakota del Norte. 2005.
93. R. D. Wilson, J. Geronimo, J. A. Armbruster. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (1997) 1239.
94. R.S.A. Grover, A.J. Cessna. *J. Environ. Qual.* 23 (6) (1994) 1304.
95. C.T. Petersen, J. Holm, C.B. Koch, H.E. Jensen, S. Hansen. *Pest. Manag. Sci.* 96 (2002) 59.
96. M. Millet, W.U. Palm, C. Zetzsch. *Ecotox. Environ. Safe.* 41 (1998) 4450.
97. G.P.L. Haberhauer, M.H. Gerzabek, F.S. Haberhauer. *J. Agr. Food Chem.* 48 (8) (2000) 3722.
98. I.S. Helweg, T.K. Formsgaard, G. Reffstrup. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 70 (1-4) (1998) 133.
99. A. Helweg. *Sci. Total Environ.* 132 (2-3) (1993) 229.
100. C. Shang, M.A. Arshad. *Can. J. Soil Sci.* 78 (1) (1998) 181.
101. R.K. Juhler, T. Hendriksen. *Pesticide in air, plant, soil & water system.* 263 (2003) 272.
102. M. R. Lee, R. J. Lee, Y. W. Lin, C. M. Chen, B. H. Hwang. *Anal. Chem.* 70 (1998) 1963.
103. G. Voos. *Appl. Soil Ecol.* 5 (2) (1997) 181.
104. A.J. Kryszowska, G.F. Vance. *J Environ. Qual.* 23 (5) (1994) 1051.
105. G. Voos, M. Pfeil. *J Agr. Food Chem.* 42 (11) (1994) 2502.
106. J. Gan, C. Wilen, D. Pittenger, D. Crowley. *Environ. Sci. Technol.* 37 (12) (2003) 2775.
107. J.D. Gaynor. *Can. J. Soil Sci.* 64 (2) (1984) 283.

CAPÍTULO 6:

***PROGRAMA DE LAS ESTEPAS CEREALISTAS.
PROTECCIÓN DEL HÁBITAT DE LA
AVUTARDA***

ÍNDICE

6.1. Introducción	285
6.1.1. Impacto Medioambiental de la Agricultura	285
6.1.1.1. Agricultura y Biodiversidad	285
6.1.1.2. Estepas Cerealistas	285
6.1.2. La Avutarda	287
6.1.2.1. Descripción	287
6.1.2.2. Distribución	289
6.1.2.3. Amenazas	291
6.1.3. Medidas de Protección	293
6.1.3.1. Política Agrícola Común	293
6.1.3.2. Programa de las Estepas Cerealistas en Castilla y León	295
6.1.4. Objetivos	296
6.2. Material y Métodos	297
6.3. Resultados y Discusión	298
6.4. Conclusiones	305
6.5. Bibliografía	306

6.1. INTRODUCCIÓN

6.1.1. IMPACTO MEDIOAMBIENTAL DE LA AGRICULTURA

6.1.1.1. Agricultura y Biodiversidad

La mitad de las tierras de la UE están destinadas a la **agricultura**. Esto pone de manifiesto la importancia que reviste la actividad agraria para el medio ambiente natural y la profunda influencia mutua que ejercen las labores agrícolas y la naturaleza [1].

Numerosos estudios han demostrado los vínculos existentes entre las prácticas agrícolas y la **biodiversidad**, de tal forma que, durante siglos la agricultura ha contribuido a la creación y conservación de diversos y valiosos hábitats seminaturales que, hoy en día, configuran la mayor parte del paisaje de la UE y acogen una gran proporción de su riqueza zoológica. Dos cambios principales han perturbado el equilibrio existente, la intensificación de la producción, por una parte, y la infrautilización de la tierra, por otra. La especialización, concentración e intensificación de la producción agraria ocurridas en las últimas décadas frente a las prácticas tradicionales que contribuyen a preservar los hábitats naturales, se reconocen como amenazas en potencia para la conservación de la biodiversidad que albergan las tierras de cultivo.

Ahora bien, unas prácticas sólidas de gestión agraria pueden tener notables repercusiones positivas en la conservación de la flora y fauna silvestres de la UE, así como en la situación socioeconómica de las zonas rurales. Uno de los objetivos sectoriales en la agricultura definidos en la “Estrategia Comunitaria en Materia de Biodiversidad” para detener la pérdida de biodiversidad de aquí a 2010, es la conservación y uso sostenible de ecosistemas agrícolas a través de la concienciación de todos los productores sobre el potencial contaminante de prácticas agrícolas específicas, tanto a corto como a largo plazo, y sobre la necesidad de que se erijan en protectores del medio ambiente [2]. En la mayoría de los Estados miembros se han aplicado medidas agroambientales para conservar la biodiversidad, lo que incluye, entre otras, la elaboración de una “Estrategia Integrada para el Uso Sostenible de los Plaguicidas” [3].

La UE ha promulgado importantes Directivas comunitarias que influyen de forma directa en el sector agrario, destacando especialmente, la Directiva 79/409/CEE, de 2 de abril de 1979, o **Directiva “Aves”** y la Directiva 92/43/CEE, de 21 de mayo de 1992, o **Directiva “Hábitats”**, que constituyen los instrumentos más importantes de la UE para conseguir la conservación de los hábitats, las especies y la biodiversidad. Ambas reconocen que la pérdida y degradación del hábitat de las aves es la amenaza más seria a la que se enfrentan. En virtud de ambas directivas se creó la **Red Natura 2000**. Está formada por las Zonas de Especial Protección para las Aves (**ZEPA**) y Zonas de Especial Conservación (**ZEC**).

6.1.1.2. Estepas Cerealistas

La mayor parte de los medios agrícolas en Europa tienen su origen en la secular acción humana ejercida sobre los bosques, mediante el fuego, el pastoreo y las talas. El resultado son paisajes abiertos, con escasa o nula cobertura arbórea y estructuralmente muy simplificados con respecto a los originales, y en los que, sin embargo, han proliferado con cierto éxito toda una serie de **aves** inicialmente asociadas a las formaciones esteparias asiáticas o norteafricanas. En la actualidad, estos paisajes representan casi la mitad de la superficie de la UE constituyendo uno de los elementos más característicos de su paisaje [4]. Muchos de estos hábitats valiosos de Europa están

sostenidos por prácticas de agricultura extensiva y numerosas especies silvestres basan en ellos su supervivencia.

Sin embargo, los agrosistemas presentan graves problemas que vienen de la mano de los planteamientos productivistas en los que han estado basados las políticas agrarias en Europa, que han orientado las explotaciones agropecuarias hacia la obtención de la máxima producción, y hacia el abandono de los sistemas extensivos, incapaces de competir en productividad. Así, las transformaciones en regadío, las concentraciones parcelarias, el abuso de agroquímicos, o el uso de maquinaria cada vez más potente, son elementos que han jugado y juegan un papel estelar en la evolución del agro europeo hacia explotaciones cada vez más eficientes en cuanto a producción pero que, a su vez, se convierten en las principales causas del declive de aproximadamente el 60% de las poblaciones de aves asociadas a estos paisajes, cuya conservación depende de las tierras agrarias [4]. Este declive generalizado de las aves del medio agrícola se viene detectando en toda Europa en los últimos veinte o treinta años y son muchas las evidencias que lo vinculan principalmente a la agricultura intensiva y al abandono de los sistemas extensivos [2]. Desde 1980, el número de aves “agrícolas” en los Estados miembros ha disminuido alarmantemente en un 30% debido al estilo intensivo de agricultura europeo, según un informe de BirdLife Internacional. El informe afirma que el uso intensivo de plaguicidas ha matado muchas de las plantas, hierbas y gusanos que sirven de alimento a estos pájaros, y muchos están muriendo de hambre [1].

Los sistemas agrarios extensivos han contribuido a que España sea una de las grandes reservas ecológicas de Europa Occidental. Muchos de los cultivos de cereal extensivos asociados a la práctica del barbecho han supuesto una práctica enriquecedora de la biodiversidad al formar ecosistemas pseudoesteparios que albergan las últimas poblaciones de algunas aves esteparias europeas amenazadas [5]. De hecho, España alberga aproximadamente el 60% de los hábitats y el 40% de las especies de interés comunitario incluidas en las Directivas “Hábitats” y “Aves”, y aporta 12 millones de hectáreas a la red Natura, el 24% de la superficie nacional.

Dentro de España, el ámbito territorial de la Comunidad Autónoma de Castilla y León tiene una superficie de 94.147 km², de los cuales 50.000 km² son llanuras, lo que supone casi dos tercios de su superficie. Una amplia extensión corresponde con la altiplanicie del Duero, que se significa por extensas llanuras de carácter sedimentario que ocupan la mayor parte del centro de la región. En estas llanuras cerealistas la práctica ausencia de otros aprovechamientos del suelo implica la total conexión entre sistema agrícola y hábitat [5], de tal manera que alberga las mayores concentraciones mundiales de una de las aves esteparias más importantes y amenazadas, la Avutarda [6]. Con frecuencia se piensa en estos paisajes abiertos y desarbolados como en espacios sin valor, y es muy habitual que no se sospeche que estas monótonas extensiones cubiertas por pequeñas matas y pastizales esconden esta especie extraordinaria.

Sin embargo, la producción cerealista española, en general, y la castellano-leonesa, en particular, es baja al estar caracterizada por una agricultura extensiva, comparada con la obtenida en los países del centro de Europa. Esto ha contribuido a la promoción de la intensificación de la agricultura para mejorar sus deficiencias, con los consiguientes problemas medioambientales, que ponen en peligro la importante comunidad de Avutardas que tiene en estas tierras su último santuario continental [7]. De hecho, las estepas cerealistas se encuentran entre los ecosistemas más amenazados de Europa, debido principalmente a la rapidez con que el hombre transforma y destruye estos hábitats [5].

6.1.2. LA AVUTARDA

6.1.2.1. Descripción

La Avutarda, una de las aves voladoras más pesadas del mundo, es una de las especies europeas más representativas de las áreas esteparias. En la Tabla 6.1 se muestra su taxonomía.

Tabla 6.1. Taxonomía de la Avutarda [8].

AVUTARDA	
Familia	Otididae
Especie	<i>Otis tarda</i> , <i>Linnaeus</i> , 1758
Phylum	Chordata
Clase	Aves
Orden	Gruiformes

Su característica más llamativa es su gran tamaño. Los machos (Figura 6.1, a la izquierda), pesan hasta 15 kg y tienen una altura de algo más de un metro, mientras que las hembras (Fig. 6.1, a la derecha) no pasan de los 4-5 kg, tienen una silueta más grácil y una coloración menos llamativa.



Figura 6.1. Macho y Hembra de Avutarda [9].

Hábitat

La estepa es su hábitat originario. Su hábitat óptimo son zonas llanas y abiertas de cereal extensivo de secano con barbechos, leguminosas de secano (alfalfa, veza), pastizales o prados naturales, y pastoreo extensivo. Evita en general las cercanías de lugares habitados o carreteras transitadas. En verano selecciona cultivos de girasol, pequeños olivares, almendrales o dehesas abiertas. En general, requiere hábitats sin molestias, grandes y abiertos.

Al contrario de lo que ocurre con las poblaciones orientales que son migradoras, las Avutardas ibéricas son sedentarias, realizando únicamente movimientos internupciales.

Reproducción

Durante la época de reproducción los machos se agregan en áreas específicas donde exhiben comportamientos de parada nupcial extremadamente elaborados (Figura 6.2). Estas áreas de relieve aplanado y sin perturbaciones, parecen jugar un papel fundamental en el éxito reproductor, por lo que son fundamentales para la conservación de la especie.



Figura 6.2. Secuencia de imágenes que muestra la “rueda”, punto culminante de la parada nupcial, en la que el macho realiza un movimiento de contorsión de su plumaje para mostrar las partes inferiores blancas y llamar así la atención de las hembras [6,9].

El nido se asienta en el suelo, en zonas exentas de material vegetal, en el interior de pastizales altos y cultivos, principalmente avena y veza, aunque también pueden usar alfalfa y parcelas labradas carentes de cualquier cobertura vegetal (Figura 6.3).



Figura 6.3. La hembra pone de uno a tres huevos de color verdoso con manchas pardas. El plumaje de los pollos es críptico, permitiéndoles camuflarse entre la vegetación para pasar inadvertidos ante sus depredadores [6,9].

Alimentación

La alimentación de la Avutarda es muy variada, compuesta de plantas e insectos. Entre las primeras, crucíferas, compuestas, gramíneas y leguminosas, y entre los segundos, coleópteros, lepidópteros, ortópteros y hemípteros son los más elegidos [9]. Otras presas, como el topillo campestre sobre todo cuando hay plagas, pueden formar parte de su dieta.

Su alimentación cambia con la estación, de manera que, en invierno y primavera consiste principalmente en cereal verde y hierbas adventicias (Figura 6.4), insectos en verano y semillas en otoño.

Cuando son pollos, la alimentación es básicamente insectívora, sobre todo en los primeros meses de vida, engullendo alimento vegetal a medida que se van desarrollando.



Figura 6.4. Grupo de hembras alimentándose en un campo de alfalfa [6].

6.1.2.2. Distribución

La distribución de la Avutarda, que en la actualidad se reduce a diversas poblaciones fragmentadas en el Paleártico, desde Marruecos y la Península Ibérica por el oeste, hasta China y Mongolia por el este, debió alcanzar máximos históricos en el siglo XVIII, gracias a las deforestaciones resultantes del desarrollo agrícola, sufriendo posteriormente, y hasta nuestros días, una constante y notable regresión en Europa, como consecuencia del crecimiento y expansión de la población humana, el desarrollo de técnicas agrícolas y la presión cinegética [10] (Figura 6.5).



Figura 6.5. Sombreadas se señalan las áreas de nidificación de la Avutarda en Europa y España [6].

Una estimación reciente cifra la población europea entre 31.000-36.000 individuos [5]. A su vez, la población de Avutardas en la Península Ibérica se ha estimado en unos

24.500 individuos [11], un 95% de los cuales se encuentran en España y el 5% restante en Portugal, lo que supone más de la mitad del total mundial estimado de esta especie [12], de ahí la gran responsabilidad que tenemos en su conservación.

El resto de poblaciones no son sólo mucho menores, sino que se encuentran además en condiciones aún mucho más inciertas de conservación que las que se dan en nuestro país. Se hallan en varios países de Europa Central y del Este además de Turquía, Rusia y Asia [11].

La Avutarda tuvo en el pasado una amplia distribución en la Península Ibérica pero la población ha ido desapareciendo de numerosas comarcas. Castilla y León alberga el 46%, seguida de Extremadura (30%), Castilla la Mancha (16%) y Madrid (5%). El resto de comunidades contienen poblaciones mucho menores, fragmentadas, y, en general, muy amenazadas [5] (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Población de la Avutarda por Comunidades Autónomas en España [11].

Comunidad Autónoma	Periodo	Población (aves)
Andalucía	2002	380
Aragón	1995-2001	115
Castilla La Mancha	1994-2001	3725
Castilla y León	1998	10680
Extremadura	1988-1993	6900
Madrid	2002	1200
Murcia	1992	15
Navarra	2001	40
España		23055

Las nueve provincias que forman la Comunidad de Castilla y León, tienen, en mayor o menor número, bandos de Avutardas en sus tierras (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Estimación de la población de Avutardas en las provincias de Castilla y León. Resumen de los resultados de censos y estimaciones más recientes [11,13-15].

Castilla y León	Censo	Año de Censo	Referencias	Cantidad estimada
Ávila	586	1998	ETI, 1998	590
Burgos	148	1998	Román et al., 1996, ETI, 1998	207
León	994	1998	ETI, 1998	1000
Palencia	1237	1998	ETI, 1998	1390
Salamanca	817	1998	Aguilera, 1992, ETI, 1998	930
Segovia	19	2004	C. Palacín	30
Soria	3	2000	C. Palacín	3
Valladolid	2544	1998	ETI, 1998	2650
Zamora	3776	1998	ETI, 1998	3900
Total	10.124	1998-2004		10.700

Es la región donde la distribución de la Avutarda es más amplia y continua, debido a la gran extensión y uniformidad de la superficie ocupada por cultivos de cereal. La vegetación natural es prácticamente nula, siendo la agricultura cerealista la que ha configurado históricamente el paisaje de este territorio.

Esta población está dividida en dos grandes sectores por el valle del Duero, con algunos núcleos marginales en las zonas orientales y suroccidentales. Las dos grandes áreas avutarderas se extienden por los campos agrícolas de Tierra de Campos con alrededor de 7.000 individuos y las campiñas meridionales en donde habitan alrededor de 3.000 individuos.

Tierra de Campos se trata de una extensa unidad geográfica de alrededor 7.000 km² que se extiende por el noroeste de Zamora, el sureste de León, noroeste de Valladolid, centro-sur de Palencia hasta una pequeña prolongación en el oeste de Burgos. Existen algunos enclaves salinos en donde son frecuentes las charcas y lagunas poco profundas. Entre las más conocidas, la de La Nava en Palencia, y las Lagunas de Villafáfila en Zamora, donde la Avutarda alcanza su máxima densidad mundial. Casi la mitad de las Avutardas castellano-leonesas se encuentran en las provincias de Zamora y Valladolid.

Las campiñas meridionales, de menor extensión, forman otra gran unidad que presentan contrastes mucho más fuertes y diversos. Se encuentran al sur del río Duero, y se extienden por el centro-oeste de Segovia, norte de Ávila, sur de Valladolid y noroeste de Salamanca hasta el sureste de Zamora.

A estas dos grandes unidades geográficas, donde se concentra el grueso de la población de Avutardas, hay que sumar otras pequeñas campiñas y páramos donde habitan núcleos formados por un número menor de ejemplares, que se hallan repartidos por el resto de las provincias de la comunidad.

En el año 1998, la Consejería de Medio Ambiente realizó el primer Censo Regional de Avutardas con efectivos poblacionales entre valores mínimos de unos 8.000 individuos en época estiva, y máximos de 10.100 individuos en primavera. Con éste, además de tener por primera vez una visión de conjunto de la región, se procedió al diseño de la red ZEPA para esta especie [10].

En síntesis, los datos disponibles sugieren una tendencia a la estabilidad en la población de Avutardas en Castilla y León, con un ligero incremento en los núcleos más centrales y mejor conservados, y disminuciones en las zonas marginales del área de distribución.

6.1.2.3. Amenazas

Las estepas cerealistas y las áreas agrícolas se encuentran entre los ecosistemas más amenazados de Europa. La vegetación esteparia está adaptada a suelos generalmente pobres y, en ocasiones, salinos. Al ser las estepas espacios muy abiertos donde llueve de forma irregular, las plantas han desarrollado sistemas de protección, lo que hace que no tengan mucha altura, y sean de crecimiento lento. Tanto el suelo como la vegetación natural de las estepas tarda muchos años en formarse y su destrucción se puede llevar a cabo en cuestión de horas, por ejemplo, por una roturación indebida.

El mantenimiento de una agricultura tradicional de secano, orientada preferentemente al cultivo del cereal, fue uno de los factores que propició la conservación de la Avutarda hasta mediados del presente siglo en España [9]. Sin embargo, a partir de los años 60 se inició una etapa de reforma de las estructuras agrarias para implantar métodos de cultivo modernos lo que implicó la sustitución de cultivos y el uso indiscriminado de

plaguicidas y abonos químicos. En 1980 se estableció su veda, ya que su caza había provocado la desaparición de muchos núcleos de reproducción [11,16]. En las últimas décadas, la intensificación agrícola (implantación de regadíos, abandono de prácticas extensivas tradicionales, roturación de pastizales naturales, pérdida de barbechos de larga duración, etc.), la expansión urbanística y proliferación de infraestructuras, la caza ilegal y la colisión con tendidos eléctricos, han sido las principales amenazas responsables de su delicada situación de conservación actual. Determinadas prácticas agrícolas, como el tratamiento con herbicidas, el laboreo de barbechos en plena primavera, o la quema de rastrojos en verano, destruyen nidos y esquilman la escasa biodiversidad que constituye el alimento para las Avutardas y otras aves esteparias.

El tamaño de la población castellano-leonesa de Avutardas, así como su tendente a la estabilidad demográfica en el conjunto de la región, no debe inducir al optimismo. Entre las mayores amenazas destacan diversos proyectos de transformación de superficies de cereal de secano de ciclo largo en regadío. El ciclo de cultivo de la veza, que en muchas zonas incluye extensiones variables dedicadas al cultivo de leguminosas, y de la alfalfa, característicos de amplias extensiones de Castilla y León, está siendo sustituido en determinadas zonas por siembras de maíz, remolacha o cereales de ciclo corto, que además de requerir cantidades más elevadas de fertilizantes y plaguicidas, en la mayor parte de los casos también necesitan ser regados artificialmente. La transformación de cultivo de secano a regadío ya ocasionó la desaparición de un núcleo reproductor en el Páramo Leonés en la década de los setenta, y amenaza hoy a las poblaciones de La Moraña y de amplias zonas de Tierra de Campos [10].

Impacto producido por los fitosanitarios

La aplicación de plaguicidas afecta negativamente a las poblaciones de Avutardas disminuyendo su reproducción, bien por ingestión directa, porque disminuyen sus fuentes de alimento [7], o porque producen alteraciones en su capacidad reproductiva.

Ha sido precisamente el uso de herbicidas e insecticidas el que ha ocasionado hace algunos años una alarmante disminución de aves insectívoras en toda España, debido a los productos tóxicos que se emplean en su elaboración [9]. Se han documentado numerosas muertes de pájaros tras la ingestión directa de semillas o insectos infectados por fitosanitarios [17]. Algunas aplicaciones masivas han tenido un fuerte impacto en las poblaciones locales de Avutardas, como es el caso de una aplicación aérea de malatión contra una plaga de langostas en Extremadura, que produjo una súbita escasez de alimento afectando negativamente las posibilidades de supervivencia de los pollos de Avutardas, y que fue sustituido en los años sucesivos por un producto más selectivo aplicado en el suelo [18,19].

Algunas de las medidas aplicadas para la protección del hábitat de la Avutarda no permiten el uso de fitosanitarios de gran espectro, y restringen el uso de fertilizantes a dosis inferiores a 80 kg/ha [3].

Categorías de Amenaza

Las amenazas anteriormente descritas a las que está expuesta la Avutarda, han supuesto su consideración como una especie Amenazada y su clasificación como Vulnerable a escala mundial [20-22] (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Categorías de Amenaza de la Avutarda y definición de los distintos Catálogos, Directivas y Convenciones [19].

Nombre científico	Nombre vernáculo	LR 04	CNEA	DIR A	UICN06	BE	BONN	SPEC
<i>Otis tarda</i>	Avutarda Común	VU	IE	I	VU	II	I,II	SPEC 1

- ❖ LR 04: Libro Rojo a Nivel Nacional: *Vulnerable* (VU). Un taxón es Vulnerable cuando la mejor evidencia disponible indica que cumple cualquiera de los criterios para Vulnerable y, por consiguiente, se considera que se está enfrentando a un riesgo alto de extinción en estado silvestre [23].
- ❖ CNEA: Catálogo Nacional de Especies Amenazadas: de *Interés Especial* (IE): Taxones que no cumpliendo los criterios para ser incluidos en otras categorías, presentan un valor particular en función a su interés científico, ecológico, cultural o por su singularidad [24].
- ❖ DIR A: Apéndice I de la Directiva 79/409/CEE, de 2 de abril de 1979, o Directiva “Aves” de la UE.
- ❖ UICN 06: Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza: *Vulnerable* (VU) [25].
- ❖ BE: Convención de Berna para la Conservación de la Vida Silvestre Europea y los Hábitats Naturales: Apéndice II: *Especies de fauna estrictamente protegidas*.
- ❖ BONN: Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres: Apéndice I: *Especies migratorias en peligro*. Apéndice II: *Especies migratorias que deben ser objeto de acuerdos*.
- ❖ SPEC 1: Categorías del *Species of European Conservation Concern*. Categoría 1: *Especies europeas calificadas como Críticamente amenazadas, Amenazadas, Vulnerables, Casi Amenazadas o Datos insuficientes bajo la Lista Roja a nivel Global*.
- ❖ Apéndice I de CITES, Convenio CITES: C1.

6.1.3. MEDIDAS DE PROTECCIÓN

6.1.3.1. Política Agrícola Común

La Política Agraria Común (PAC) fue instaurada en el momento de la creación de la UE (1957, Tratado de Roma) y constituye uno de sus ejes más fundamentales. Se organizó, en origen, con un sentido económico, orientada al aumento de la producción agrícola, apoyando y fomentando la intensificación y la competitividad de los mercados para solventar los problemas de abastecimiento como consecuencia de la Segunda Guerra Mundial. Este enfoque provocó grandes problemas medioambientales, incluyendo una enorme pérdida de biodiversidad silvestre y agrícola.

Con el objeto de solventar todos estos efectos, la PAC ha sufrido sucesivas reformas en sus normas y su orientación. En 1992 mediante la promulgación del Reglamento CEE 2078/92/CEE del Consejo, de 30 de junio de 1992, sobre métodos de producción agraria compatibles con las exigencias de la protección del medio ambiente y la conservación

del espacio natural, se hace obligatoria la aplicación de programas agroambientales para los Estados miembros en sus planes de desarrollo rural. En esta reforma se aprueban varias medidas de acompañamiento, entre ellas las agroambientales, que establecen ayudas compensatorias por la merma de producción en explotaciones agropecuarias debido a la aplicación de métodos compatibles con la protección del medio ambiente.

El Consejo Europeo de Helsinki, adopta en diciembre de 1999, la estrategia para la integración de la dimensión ambiental de la PAC modificando definitivamente su arquitectura que pasa a descansar en dos pilares. El primero, el Reglamento CE 1259/99 del Consejo, por el que se establecen las disposiciones comunes aplicables a los regímenes de ayuda directa en el marco de la PAC, incorpora las clásicas medidas de mercado, mientras que el segundo, Reglamento CE 1257/99 del Consejo, de 17 de mayo de 1999, sobre la ayuda al desarrollo rural a cargo del Fondo Europeo de Orientación de Garantía Agrícola (FEOGA), se consagra al medio rural, reagrupando medidas de carácter productivo con otras de índole socioeconómica o de carácter ambiental, en las que quedan encuadradas las medidas agroambientales y las ayudas en zonas desfavorecidas.

La reforma de la Agenda 2000, incluye el principio del cumplimiento de los requisitos de protección medioambiental por parte de los agricultores como condición para beneficiarse de las ayudas. Aquellos que se comprometen, durante un periodo mínimo de cinco años, a adoptar técnicas agrarias respetuosas con el medio ambiente, reciben a cambio pagos en compensación por los costes adicionales y la disminución de renta derivados de los cambios. Más de una tercera parte de la aportación comunitaria al desarrollo rural (FEOGA) se ha gastado en medidas agroambientales en el periodo 2000-2002.

La reforma de la PAC de 2003 hace un mayor hincapié en la ecocondicionalidad, manteniendo el carácter obligatorio de los planes agroambientales para los Estados miembros, mientras que siguen siendo optativos para los agricultores. Sin embargo, la ecocondicionalidad se convierte en obligatoria a partir de 2005 para todos los agricultores que perciben ayudas directas, según el Reglamento (CE) nº 1782/2003 del Consejo, y el Reglamento (CE) nº 796/2004 de la Comisión.

Las ayudas agroambientales deben incluir normas relativas a la protección del suelo, el mantenimiento de la materia orgánica y la estructura del suelo, y la conservación de los hábitats y del paisaje, incluida la protección de los pastos permanentes. Con estas medidas se pretende frenar el problema del deterioro del medio ambiente mediante el fomento de prácticas agrícolas compatibles con la protección de la naturaleza. Algunos ejemplos de compromisos cubiertos por los planes agroambientales nacionales y regionales son:

- La extensificación de la actividad agraria de manera favorable para el medio ambiente mediante la retirada de tierras en el sector de los cultivos herbáceos, y la práctica del barbecho;
- La conservación del paisaje y de rasgos históricos tales como setos, zanjas y bosques;
- La conservación de los hábitats de gran valor y de la biodiversidad a ellos asociada;
- El cumplimiento de la aplicación de normas específicas sobre el uso de productos fitosanitarios.

6.1.3.2. Programa de las Estepas Cerealistas en Castilla y León.

Debido a que las Avutardas tienen en Castilla y León su último santuario continental, se viene desarrollando un complejo y costoso programa de protección de la especie por parte de la UE que ofrece compensaciones a los agricultores que no utilicen prácticas agrícolas nocivas para la fauna.

El *Programa de las Estepas Cerealistas*, aprobado por la Comisión mediante la Decisión de 16 de septiembre de 1993, entra en vigor en Castilla y León en 1993. Se aplica a 1,6 millones de hectáreas en la región, englobando las Comarcas de Tierra de Campos, al norte del Duero, y de Tierra de Campiñas al sur, con el objetivo de preservar el hábitat de la Avutarda.

Este programa tiene su origen en el *Programa Zona* aprobado en 1992 por la UE a través del mecanismo establecido en el Art. 7 del Reglamento CEE 2078/92, métodos de producción agraria compatibles con las exigencias de la protección del medio ambiente y la conservación del espacio natural, y el Reglamento CEE 1765/92, cultivos afectados por el programa.

El programa fomenta la adaptación de cultivos y técnicas agrícolas adecuadas a las necesidades del hábitat de las aves esteparias para su conservación activa, mediante el mantenimiento y/o reintroducción de métodos de producción agraria compatibles con la conservación de la fauna de las estepas cerealistas. Esto se consigue a través de la dotación de subvenciones a los agricultores que se comprometan a utilizar prácticas agrícolas tendentes a la protección del medio ambiente. Tendrán derecho a percibir las ayudas previstas en el programa, los titulares de las explotaciones agrícolas que se comprometan en un periodo mínimo de cinco años a realizar algunas de las actuaciones señaladas en el programa en toda o en parte de su explotación, respetando como mínimo las Buenas Prácticas Agrícolas. Incluye entre sus actuaciones principales, la reducción del empleo de fertilizantes químicos y fitosanitarios, y la promoción de la agricultura y ganadería ecológicas en zonas donde habiten Avutardas.

El programa incluye fórmulas de financiación de las medidas y un régimen de control y sanción común, además de exigir la presentación de un Plan de Explotación para comprobar la realización de los compromisos suscritos por el titular de la ayuda, en el que se describan las acciones a realizar, su ubicación por parcelas, cuantía y composición de abonos, fitosanitarios, residuos orgánicos, etc., aludiendo al compromiso que se adquiera, según corresponda a las medidas solicitadas.

El programa contempla 4 tipos de contratos:

Contratos 1 y 2: Conservación de la Estepa Cerealista: Entre otras medidas, exige el uso único de herbicidas del tipo AAA o “Baja Toxicidad”, y éstos dentro de unos niveles fijados, lo cual hace necesario el llevar a cabo un control mediante análisis programados.

Contrato 3: Retirada de Tierras para Fines Medioambientales.

Contrato 4: Conservación de la Diversidad Biológica.

La primera fase de este programa, se desarrolla entre 1993 y 1998, por la *ORDEN de 17 de noviembre de 1993*, BOCyL de 18 de noviembre, de la Consejería de Presidencia y Administración Territorial, para la regulación de las ayudas a las explotaciones que desarrollen prácticas agrícolas tendentes a la protección del medio ambiente y que radiquen en su ámbito de aplicación.

En 1998 se amplía por cinco años, según la *ORDEN de 15 de enero de 1998*, BOCyL de 19 de enero, de la Consejería de Presidencia y Administración Territorial, por la que se regulan las ayudas a las explotaciones que desarrollen prácticas tendentes a la protección del medio ambiente en las estepas cerealistas de Castilla y León.

El nuevo Reglamento de Desarrollo Rural, programa estas medidas para el periodo 2000-2006, según la *ORDEN de 11 de julio de 2002*, BOCyL de 17 de julio, de la Consejería de Agricultura y Ganadería, por la que se regula el régimen de ayudas de medidas agroambientales de sistemas de extensificación para la protección de la flora y fauna.

6.1.4. OBJETIVOS

- Dar cumplimiento al Programa de las Estepas Cerealistas para proteger el Hábitat de la Avutarda, mediante el análisis de residuos de herbicidas en muestras de suelo procedentes de zonas agrícolas cuyos propietarios reciben subvenciones tras haberse comprometido a utilizar únicamente herbicidas de tipo AAA o “Baja Toxicidad”, como una de las medidas del programa. Se recogen los análisis realizados durante los años 2002, 2003 y 2004.
- Analizar una amplia variedad de herbicidas utilizados en cebada, cultivo mayoritario en el hábitat de la Avutarda en Castilla y León, ya que el carácter de confidencialidad de las ventas de herbicidas de las casas comerciales no permite precisar el tipo y cantidades de fitosanitarios más utilizados. La selección de herbicidas y su análisis mediante GC-MS se expuso en el Capítulo 2, mientras que el pre-tratamiento y la extracción de las muestras de suelo se llevan a cabo según el método optimizado en el Capítulo 3.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

La localización del muestreo y el número de muestras tomadas se planteó en función de las poblaciones de Avutardas existentes en cada provincia (Figura 6.6 y 6.7). El mayor número de muestras durante todos los años se recogieron en Zamora, Valladolid, Palencia, y León, ya que son, por ese orden, las provincias donde existe mayor número de individuos. De la misma manera la provincia de Soria no se muestreo ningún año ya que la Avutarda es allí prácticamente inexistente (Tabla 6.3).

Las Secciones de Ayudas Agrícolas del Servicio Territorial de Agricultura de cada provincia, fueron las encargadas de recoger las muestras de suelo entre Mayo y Junio, fecha en la que se cosecha la cebada, mandándolas lo antes posible al laboratorio para su análisis.

El número de muestras recibidas fue de 198 en 2002, 164 en 2003, y 100 en 2004, lo que hizo un total de 462 muestras de suelo analizadas.

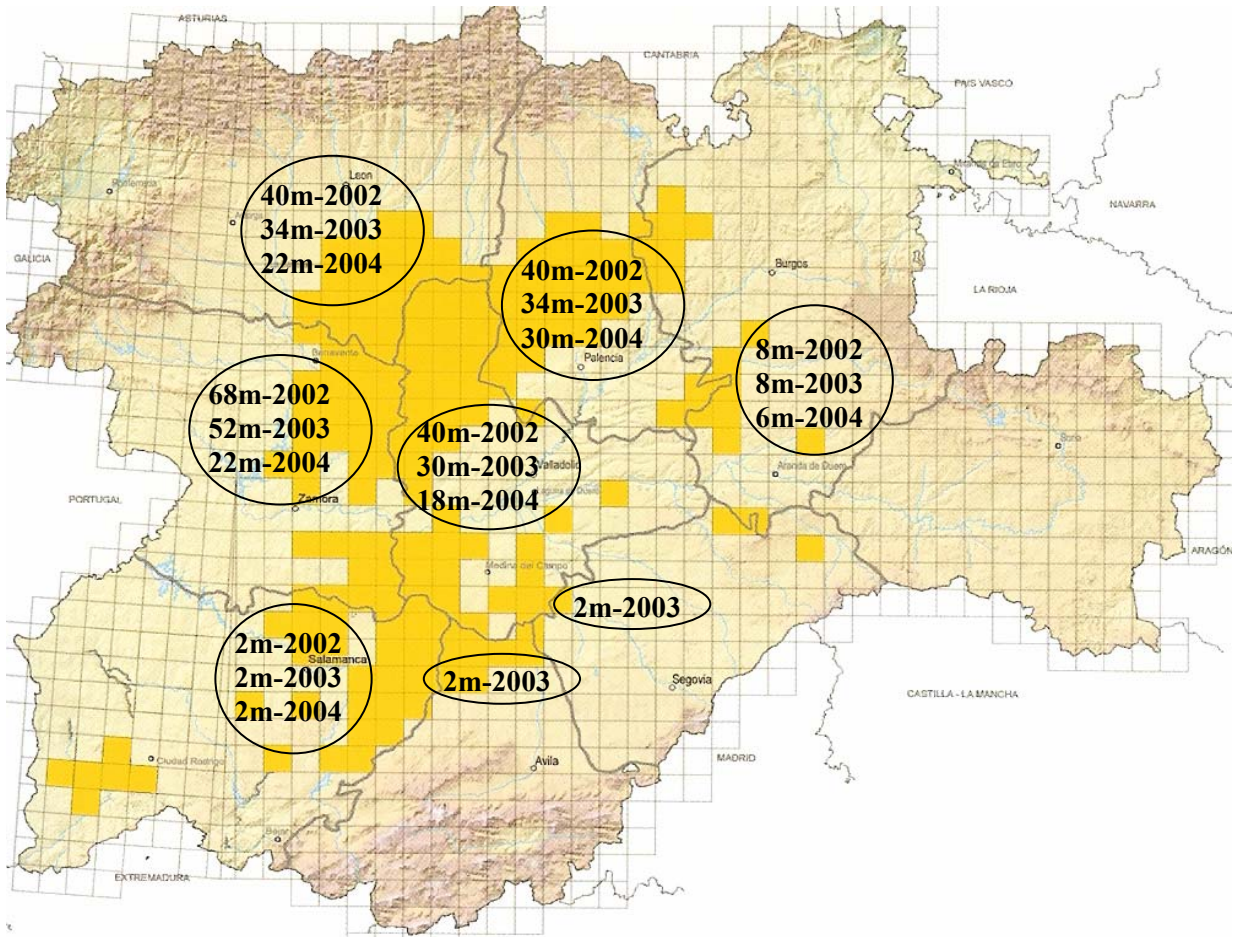


Figura 6.6. Nº de muestras por provincias, sujetas al Programa de las Estepas Cerealistas, tomadas durante los años 2002, 2003 y 2004. Las cuadrículas marcan la distribución de la Avutarda (UTM 10 x 10) [6].

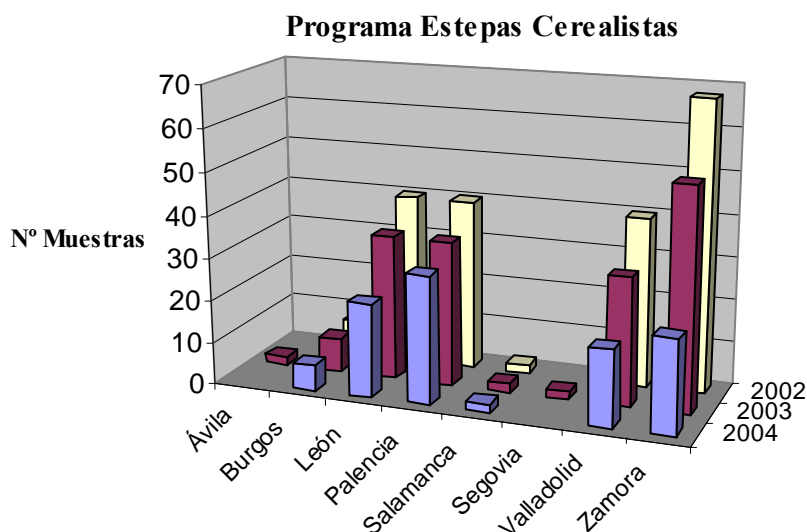


Figura 6.7. Nº de muestras por provincias, sujetas al Programa de las Estepas Cerealistas, tomadas durante los años 2002, 2003 y 2004.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 6.5, 6.6 y 6.7, para los años 2002, 2003 y 2004, respectivamente.

Los positivos obtenidos se confirmaron mediante el cumplimiento de una serie de requisitos en los tiempos de retención y los iones de los espectros de masas respecto de los patrones, tal y como se había comentado en el Capítulo 2. Los resultados obtenidos se expresaron en mg/kg y con el nombre químico definido según el LMR. Aquellos valores inferiores al LC se presentaban como “< LC”, y como “< LD” aquellos para los que no se encontraban residuos (datos presentados en blanco en las Tablas 6.5, 6.6 y 6.7).

Respecto del análisis de las muestras de suelo, análogamente a lo detallado en el Capítulo 5, si había presencia de ésteres originales en la alícuota sin derivatizar, se cuantificaban las alícuotas derivatizadas con una mezcla de patrones de ésteres originales y ácidos derivatizados de la misma manera que las muestras. Pero si no había residuos de los ésteres originales porque ya se habían hidrolizado, se cuantificaban las alícuotas derivatizadas con una mezcla de los patrones de los ácidos únicamente. Ambos resultados de los ésteres originales y metílicos (resultado de la derivatización), se tenían en cuenta conjuntamente y se daban como resultado global del herbicida, sin detallar la forma de la que provenían.

Tabla 6.5. Resultados obtenidos para el año 2002 en mg/kg. Se indica la fecha de muestreo en cada provincia y los herbicidas de los cuales se han encontrado residuos. “< LC”, resultados menores que el límite de cuantificación.

2002		BURGOS: 14-may-02																																													
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8																																							
Clortolurón																																															
Terbutrina				< LC																																											
		LEÓN: 8-may-02																																													
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
Clortolurón	< LC			0,16							< LC	< LC					< LC			0,04					0,11							< LC															
Terbutrina				< LC																< LC																											
		PALENCIA: 9-may-02																																													
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
Clortolurón																				< LC									0,04	< LC			< LC				0,04										
Terbutrina							< LC																																								
		SALAMANCA: 30-may-02																																													
Nº	1	2																																													
Clortolurón	< LC	0,16																																													
Terbutrina		< LC																																													
		VALLADOLID: 28-may-02																																													
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
Clortolurón					0,08	0,06		< LC																																							
Terbutrina					< LC	< LC																																									
		ZAMORA: 20-may-02																																													
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
Clortolurón		< LC	0,12	0,13	0,08	< LC	0,12	0,41			0,06				0,03	0,12	0,07	0,07																					0,06	0,44	0,29				0,05	0,09	0,15
Terbutrina							< LC				< LC				< LC	< LC	< LC	< LC																													
		ZAMORA: 22-may-02																																													
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28																			
Clortolurón			0,17						0,89	0,12										< LC	< LC		< LC																								
Terbutrina			< LC																	< LC	< LC																										

Tabla 6.7. Resultados obtenidos para el año 2004 en mg/kg. Se indica la fecha de muestreo en cada provincia y los herbicidas de los cuales se han encontrado residuos. “< LC”, resultados menores que el límite de cuantificación.

2004		BURGOS: 2-jun-04						LEÓN: 4-jun-04																						
Nº	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Clortolurón			0,018	0,29															0,055	0,096			0,012			0,024				
Terbutrina																														
Isoproturon																									< LC					
Diflufenican			0,063	0,21																										
		PALENCIA: 31-may-04																												
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Clortolurón			0,081									0,8	0,21			0,013								0,017			0,2	0,45		
Terbutrina																														
Isoproturon												0,012	< LC											< LC						
Diflufenican			0,024		0,081										0,045											0,15	0,16			
		SALAMANCA: 8-jun-04																												
Nº	1	2																												
Clortolurón																														
Terbutrina																														
Isoproturon																														
Diflufenican																														
		VALLADOLID: 31-may-04																												
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18												
Clortolurón																														
Terbutrina																														
Isoproturon																														
Diflufenican																														
		ZAMORA: 27-may-04												ZAMORA: 30-may-04																
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	1	2	3	4	5	6								
Clortolurón					0,024	0,14	0,14					0,13	0,084									<LC	<LC							
Terbutrina																														
Isoproturon									0,051																					
Diflufenican									0,57		< LC				0,26				< LC					0,015	0,017					

La mayoría de los resultados cuantificados superaron el LMR propuesto para las muestras de suelo, es decir, 0,05 mg/kg.

En ningún caso se detectaron formas esterificadas de los herbicidas, debido a su rápida hidrólisis en el suelo incrementada en condiciones de campo. Se observa que, en general, se detectaron pocos residuos (Figura 6.8), y los herbicidas eran similares para todos los años, siendo 2003 el año en que se encontró una mayor variedad. El porcentaje de positivos tan alto obtenido en Salamanca para el año 2002, se debió a que sólo se tomaron dos muestras y ambas eran positivas. En general, el mayor porcentaje de positivos se encontró en Zamora, ya que era donde más muestras se recogieron, al ser la provincia que alberga la mayor población de Avutardas.

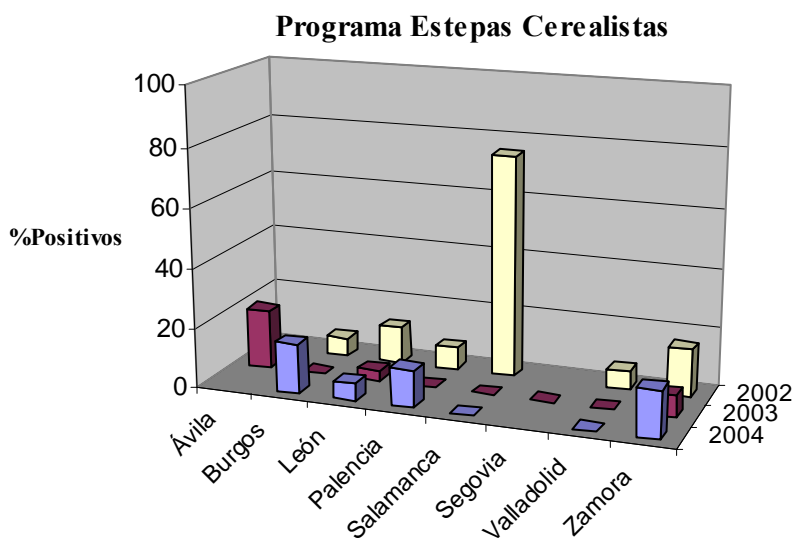


Figura 6.8. Porcentaje de los herbicidas detectados en función de las muestras tomadas para cada provincia y año.

Se ha observado, en general, que los residuos de herbicidas encontrados en las tierras de cultivos hábitat de las Avutardas, correspondían a unas cuantas familias bien definidas, frente a la gran variedad de materias activas que pueden aplicarse en cebada. Múltiples razones pueden explicar que no se detecten ciertos productos fitosanitarios. Puede que el producto no haya sido aplicado en el campo o bien se haya aplicado en cantidades muy pequeñas.

Una segunda razón tiene que ver con las propiedades físico-químicas de los productos fitosanitarios (Tabla 6.8), ya que hay ciertos herbicidas que son muy poco persistentes en el suelo y presentan tiempos de vida muy cortos. Hay que tener en cuenta que la cebada cultivada era de ciclo largo, sembrándose en Noviembre, y tratándose en pre-emergencia durante ese mes y en post-emergencia en Febrero. Las muestras se recogían durante la época de cosecha, Mayo-Junio, y por tanto, aquellos herbicidas poco persistentes ya se habían disipado.

La tendencia general durante los pasados 30 ó 40 años ha sido hacia la introducción de productos con dosis más bajas de aplicación, menor persistencia medioambiental y menor toxicidad debido a mayores tasas de degradación. Por ejemplo, la movilidad en el suelo de los fenoxiacidos es alta, su persistencia escasa, y se descomponen rápidamente

[26], por lo que no se encontraron residuos de estos compuestos, como ya se había comprobado en los ensayos en campo desarrollados en el Capítulo 5. Lo mismo ocurría con las Sulfonilureas, muy inestables y usadas a muy bajas dosis, por lo que no se acumulaban en el suelo.

Tabla 6.8. Características de los Herbicidas detectados.

Herbicida Detectado	Solubilidad Lixiviación	Volatilidad	Polaridad	Adsorción	Persistencia	Toxicidad	Efectos en Humanos
Clortoluron	Moderada	Baja	Media	Moderada	Moderada	BajaABA	Potencial carcinógeno Posible carcinógeno
Terbutrina	Moderada	Alta	Base débil	Alta	Alta	XiAAB	Potencial disruptor endocrino
Triatato	Baja	Muy Alta	Apolar	Alta	Alta	BajaABA / BajaXiAB	Potencial carcinógeno
Isoproturon	Moderada	Baja	Media	Moderada	Moderada	XnAA	Potencial carcinógeno
Diflufenican	Baja	Moderada	Apolar	Alta	Alta	XnAA (+ Isoproturon)	

En el año 2002 se detectaron residuos de dos herbicidas que suelen usarse en mezclas, Clortoluron y Terbutrina (Figura 6.9), y actúan contra malas hierbas de hoja ancha y estrecha, en pre y post-emergencia precoz.

Las Fenilureas, a las que pertenece el Clortoluron, son químicamente estables, poco solubles en agua y persistentes en el suelo al ser adsorbidas por la arcilla y el humus. Su movilidad en el terreno es pequeña y se descomponen por la acción microbiana, por eso los suelos pobres en materia orgánica, como los de las estepas cerealistas, tienden a acumularlas.

La Terbutrina, que pertenece a la familia de las Triazinas, se adsorbe fuertemente ya que se fija en las arcillas. Su persistencia en el suelo es mayor que la de las Fenilureas, ya que tienen una elevada estabilidad química y se degradan más lentamente [28]. Son poco solubles en agua, por lo que su movilidad en el suelo es pequeña. En suelos con poco contenido en materia orgánica, como los de las estepas cerealistas, se favorece la adsorción y, por tanto, la persistencia. Fue uno de los herbicidas ensayados en campo, donde había demostrado su persistencia en este tipo de suelos.

En otros estudios de muestreo de fincas agrícolas de cereal con manejo agrícola, se detectaron análogamente residuos de Clortoluron y Terbutrina, resultando sus vidas medias mayores que las obtenidas en ensayos más cortos realizados en parcelas experimentales, probablemente debido al incremento de la adsorción [27].

En el año 2003, además de los dos herbicidas anteriores, se detectaron también dos herbicidas que suelen usarse en combinación, Diflufenican e Isoproturon (Figura 6.10), principalmente contra malas hierbas de hoja ancha y estrecha en pre y post-emergencia temprana. El Diflufenican, que pertenece a las nicotinalidas, suele ser adsorbido en mayor medida que el Isoproturon, habiendo demostrado este último su persistencia en los ensayos en campo desarrollados en el Capítulo 5.

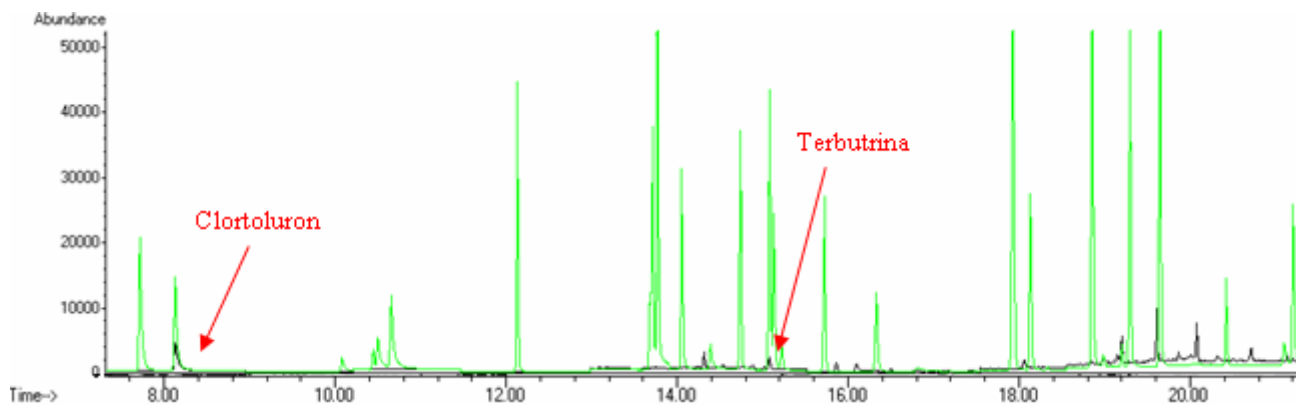


Figura 6.9. Cromatograma de muestra de suelo (en negro) con residuos de Clortoluron y Terbutrina. En verde se presentan los patrones.

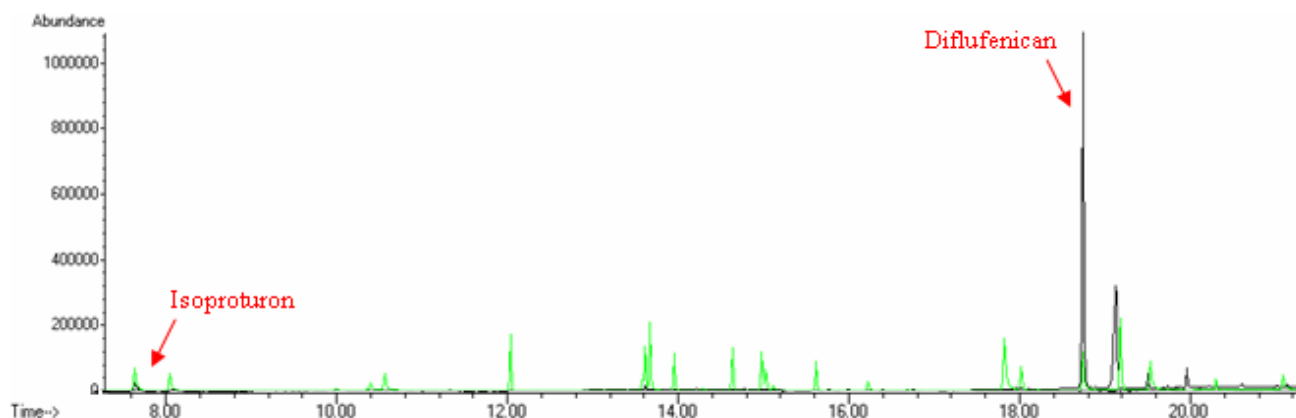


Figura 6.10. Cromatograma de muestra de suelo (en negro) con residuos de Isoproturon y Diflufenican. En verde se presentan los patrones.

En 2003 también se hallaron residuos de Trialato, herbicida usado principalmente contra malas hierbas de hoja estrecha en cebada antes de la siembra y pre-emergencia. En los estudios en campo había mostrado una gran degradación inicial a causa de su elevada volatilidad, aunque también era el herbicida más persistente de entre los ensayados. En numerosos estudios llevados a cabo en zonas agrícolas se encontraba que el Trialato era muy persistente, manteniéndose en el suelo a concentraciones muy bajas durante largo tiempo [26,29].

En el año 2004 se volvieron a encontrar residuos de Clortoluron, Isoproturon y Diflufenican, además de Terbutrina. Ésta ya se había prohibido, en cumplimiento de lo dispuesto en el reglamento CE 2076/2002, de 20 de noviembre (DOCE 23/11/02), y había comenzado su proceso de retirada. La detección de sus residuos, pudo deberse a que los agricultores utilizaron las reservas que tenían de esta materia activa, ya que el plazo límite para la comercialización de existencias se había fijado a 31 de octubre de 2003, y el plazo máximo de utilización, a 31 de diciembre de 2003.

6.4. CONCLUSIONES

1. Con el análisis de residuos de herbicidas en muestras de suelo procedentes de zonas sujetas al programa de las estepas cerealistas, se da cumplimiento a este programa y se protege el hábitat de la Avutarda.
2. Al mismo tiempo estos suelos sirven como un amplio muestreo de fincas agrícolas de cereal de invierno pertenecientes a las estepas cerealistas, en donde se detectan, entre otros, residuos de Isoproturon, Trialato y Terbutrina, resultados que corroboran los obtenidos en los ensayos en campo, ya que estos herbicidas se encuentran entre los más persistentes.
3. En general, los residuos detectados en las tierras de cultivo hábitat de las Avutardas, corresponden a unas cuantas familias bien definidas, frente a la gran variedad de materias activas que pueden aplicarse en cebada. Una posible explicación es que desde que se realizan los tratamientos hasta el muestreo, aquellos herbicidas no persistentes ya se han disipado.
4. En el año 2002 se detectan residuos de dos herbicidas que suelen usarse en mezclas, Clortoluron y Terbutrina. Los suelos con poco contenido en materia orgánica, como los de las estepas cerealistas, favorecen la adsorción y, por tanto, la persistencia de estos dos herbicidas. El porcentaje de positivos tan alto obtenido en Salamanca para el año 2002, se debe a que sólo se analizan dos muestras y ambas son positivas. En general, el mayor porcentaje de positivos se encuentra en Zamora donde más muestras se recogen, al ser la provincia que alberga la mayor población de Avutardas.
5. En el año 2003, además de los dos herbicidas anteriores, se detectan también dos herbicidas que suelen usarse en combinación, Diflufenican e Isoproturon. Este año también se hallan residuos de Trialato, herbicida que muestra una gran degradación inicial a causa de su elevada volatilidad en los estudios en campo, aunque también es el más persistente. Es el año en el que se encuentra una mayor variedad de herbicidas.
6. En el año 2004 se prohíbe la Terbutrina y aún así se detectan sus residuos, debido, probablemente, a que los agricultores utilizaron las reservas que tenían de esta materia activa ya que el plazo límite para la comercialización de existencias se fija a 31 de octubre de 2003, y el plazo máximo de utilización, a 31 de diciembre de 2003.

6.5. BIBLIOGRAFÍA

1. U. Gallo-Orsi. "Saving Europe's most threatened birds: progress in implementing European Species Action Plans". BirdLife International. Wageningen, Holanda. 2001.
2. Comunicación 162 de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. "Plan de Acción sobre Biodiversidad en la Agricultura". Bruselas. 2001.
3. Decisión 1600/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2002, por la que se establece el VI Programa de Acción Comunitario en materia de Medio Ambiente.
4. I. de la Concha, C. Hernáez, J. Pinilla. "Medidas beneficiosas para las aves, financiadas a través del nuevo reglamento de desarrollo rural. Sugerencias para su diseño y aplicación en NATURA 2000". SEO BirdLife. 2006.
5. Libro blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural. MAPyA. 2003. Formato electrónico en www.libroblancoagricultura.com.
6. J. Sanz-Zuasti, J. García, C. Sánchez. "Las aves esteparias en Castilla y León. Distribución, población y tendencia". Consejería de Medio Ambiente. Junta de Castilla y León. 2006.
7. L. Buguñá Hoffmann. "Agricultural functions and biodiversity - A European stakeholder approach to the CBD agricultural biodiversity work programme". European Centre for Nature Conservation. 2001.
8. "Catálogo Nacional de Especies Amenazadas". (R.D. 439/1990) Ministerio de Medio Ambiente. 2003.
9. J. Sanz-Zuasti, G. Sierra González, C. Sánchez Alonso, J. Martín Simón. "Tierra de Avutardas. La Llanura Cerealista de Castilla y León". Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Castilla y León. 1995.
10. J.C. Alonso, C. Palacín, C.A. Martín (Eds). "La Avutarda Común en la Península Ibérica: población actual y método de censo". SEO/BirdLife. Madrid. 2005.
11. J.C. Alonso, C. Palacín, C.A. Martín. *Biol. Conserv.* 110 (2003) 185.
12. G.M. Tucker, M.F. Heath. "Birds in Europe: their conservation status". BirdLife Conservation Series, nº3. BirdLife Internacional. Cambridge. 1994.
13. S.L. Eti. "Elaboración de un estudio poblacional de la avutarda en Castilla y León". Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Castilla y León. Valladolid. 1998.
14. J. Román, F. Román, L.M. Ansola, C. Palma, R. Ventosa. "Atlas de las aves nidificantes de la provincia de Burgos". Caja de Ahorros de Burgos. 1995.
15. R.A. Aguilera. *Alytes* 10 (1992) 187.
16. C. Palacín, J.C. Alonso, C.A. Martín, J.A. Alonso, M. Magaña, B. Martín. "Avutarda Común (Otis Tarda)". En "Libro Rojo de las Aves de España". A. Madroño, C. González, J.C. Atienza (Eds.). SEO/BirdLife y Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid. 2004.
17. B.F. Rasmussen. *Sci. Total Environ.* 188 (1996) 45.
18. J. Hellmich. *Ardeola* 39 (1992) 7.

19. C. Papazoglou, K. Kreiser, Z. Waliczky, I. Burfield. "Birds in the European Union: a Status Assessment". Birdlife International. Comisión Europea. 2004.
20. N.J. Collar, M.J. Crosby, A.J. Stattersfield. "Birds to watch 2: the world list of threatened birds". BirdLife Conservation Series, nº4. Cambridge. 1994.
21. B. Heredia, L. Rose, M. Painter. "Globally threatened birds in Europe. Action plans". Publicación del Consejo Europeo. Estrasburgo. 1996.
22. F.M. Chapman. "Threatened birds of the World". Lynx Editions & BirdLife Internacional. Barcelona & Cambridge. 2000.
23. A. Madroño, C. González, J.C. Atienza. "Libro Rojo de las Aves de España". Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife. Madrid. 2004.
24. Real Decreto 439/1990 de marzo de 1990 (B.O.E. de 5 de abril de 1990), sobre las Categorías de amenaza del Catálogo Nacional de Especies Amenazadas.
25. UICN. "Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1". Comisión de la Supervivencia de Especies de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Gland, Suiza & Cambridge, Reino Unido. 2001.
26. J.J. Miller, C. Chang, C.W. Lindwall. Can. J. Soil Sci. 75(3) (1995) 349.
27. A.E. Smith. Environ. Qual. Safe. 3 (1975) 266.
28. J. Tekel, J. Kovacicová. J. Chromatogr. A 643 (1993) 291
29. B.P. Gottesburen, G. Kreuzig, W. Ebing. Berichte uber Landwirtschaft 70 (2) (1992) 259.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

La investigación desarrollada en la presente memoria supone una aportación al estudio de la metodología analítica para la determinación de 37 herbicidas de características físico-químicas muy diferentes, utilizados en cebada. Esta metodología ha sido aplicada al estudio de la disipación de algunos de estos herbicidas en suelo en condiciones reales de campo, así como al análisis de residuos en un amplio muestreo de fincas agrícolas de cereal sujetas al Programa de Ayudas Agroambientales de las Estepas Cerealistas de Castilla y León.

1.-Desarrollo del Método de Análisis de 37 Herbicidas

La técnica analítica seleccionada para el análisis multiresiduo de los herbicidas de estudio es GC-MS con cuadrupolo y detección en modo SIM, porque proporciona una adecuada linealidad, y la suficiente selectividad y sensibilidad. Aún así, el LC-(ESI)-MS/MS es el equipo más universal, demostrando su gran versatilidad, sensibilidad y selectividad, ya que es la única técnica capaz de analizar simultáneamente prácticamente todos los herbicidas susceptibles de aplicarse en cultivos de cebada.

Se dividen los analitos en tres grupos para su análisis por GC, los directamente analizables, los analizables en forma de sus productos de degradación térmica y los que necesitan derivatización previa.

La optimización de la reacción de derivatización con TMSH mediante un diseño ortogonal, proporciona un método sencillo en el que sólo hay que añadir el reactivo derivatizante en el vial de análisis y la metilación se produce directamente en el inyector del sistema cromatográfico.

El TMSH promueve la formación de los ésteres metílicos a partir de dos reacciones, la derivatización directa de los ácidos/fenoles, y la trans-esterificación de otros ésteres de esos compuestos. La adición de TMSH proporciona un pH básico adecuado, pero los rendimientos de la esterificación y la trans-esterificación se ven disminuidos en presencia de ácido acético, lo que provoca que permanezcan los ésteres originales en cierta medida.

Se propone la adición de ácido acético al disolvente de análisis, ya que tiene un efecto protector al interaccionar con los sitios activos de la inyección y de la columna, aumentando las respuestas de los herbicidas termodegradables además de los hidroxibenzonitrilos y el Fenoxaprop.

Las muestras a analizar por GC-MS se dividen en dos alícuotas, para las que se usan columnas diferentes. En la primera se determinan directamente los herbicidas analizables por GC y los productos de degradación térmica. A la segunda se le añade el TMSH para analizar los herbicidas ácidos, que necesitan derivatización previa, comparándolos con patrones derivatizados de la misma manera.

Se ha realizado un estudio exhaustivo del efecto matriz, aplicando el test de ajuste a una línea, como el más restrictivo, entre un calibrado preparado sobre extracto blanco de matriz (calibrado en matriz) y otro preparado sobre el disolvente de análisis. Se propone que cuando deban cuantificarse diferentes muestras, se haga con calibrados en matriz, para evitar las recuperaciones excesivamente altas, y porque representa mejor el estado real de las muestras.

2.-Desarrollo del Método de Extracción de 37 Herbicidas en Suelos

La agitación durante 30 min de 15 g de suelo con 7,5 ml de agua en combinación con 30 ml de acetona al 1% en ácido acético, mejora sensiblemente la recuperación de los herbicidas ácidos, sin detrimento de la recuperación de los básicos y neutros, y sin necesidad de ajustar el pH previamente al reparto con 30 ml de diclorometano y sulfato sódico anhidro. Es un método sencillo que extrae conjuntamente un amplio rango de herbicidas de características físico-químicas muy diferentes.

La concentración de los extractos, independientemente de su naturaleza, debe hacerse a 35°C, con adición de 50 µl de etilenglicol al 20% en acetona y sin permitir alcanzar la sequedad total, ya que con ello se evita al máximo las pérdidas por volatilización.

El uso de distintos adsorbentes de SPE y dSPE no es efectivo para la limpieza de los extractos de suelo del método multiresiduo ya que los herbicidas tienen un amplio rango de polaridades y no es posible encontrar una limpieza universal que no retenga alguno de ellos.

El método multiresiduo de extracción de 37 herbicidas en suelos ha sido validado hasta 250 µg/kg, proporcionando buenas recuperaciones y precisión para los herbicidas ácidos, básicos y neutros, según las recomendaciones europeas.

3.-Desarrollo del Método de Extracción de 37 Herbicidas en Grano y Paja de Cebada

Como resultado de la modificación del método *QuEChERS* para muestras secas de cereal y la comparación con procedimientos multiresiduo clásicos para herbicidas en muestras de cebada, realizada durante una estancia en el Departamento de Plaguicidas y Contaminantes de RIKILT (Holanda), se extraen las siguientes conclusiones:

- La modificación realizada en el método *QuEChERS* es adecuada puesto que es el único método que proporciona recuperaciones medias en torno al 60-70% para todos los compuestos. Sin embargo, los resultados no son adecuados para validar el procedimiento ya que los residuos de herbicidas se unen fuertemente a las matrices secas y las recuperaciones no alcanzan los criterios europeos. (Los creadores del método han modificado recientemente las sales que se usaban en el método original para mejorar los resultados en este tipo de muestras).
- Todos los herbicidas no polares se recuperan bien con todos los procedimientos, siendo su extracción incrementada cuando se usan disolventes apolares y no se incluyen etapas de limpieza del extracto. La eficiencia en la recuperación es: mini Luke > acetona > *QuEChERS* > acetato de etilo. Las menores recuperaciones con el acetato de etilo se explican por las pérdidas que sufren algunos analitos en el proceso de limpieza por GPC, y otros en la doble evaporación del disolvente.
- La eficiencia en la recuperación de herbicidas ácidos es contraria a la recuperación de los apolares: *QuEChERS* = acetato de etilo > mini Luke > acetona, y los resultados son inaceptablemente bajos para todos los métodos estudiados.

De la posterior adaptación de los métodos en función de las posibilidades de equipamiento del Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Sensorial del ITACyL, se extraen las siguientes conclusiones:

- El método *QuEChERS* proporciona recuperaciones medias aceptables para todos los analitos pero algo menores para los herbicidas más volátiles, ya que es necesario concentrar el extracto antes de su análisis, a pesar del uso del etilénglicol y bajas temperaturas. El método *Buffered QuEChERS* proporciona peores resultados en general.
- El método del Acetato de etilo es el escogido para los herbicidas básicos y neutros ya que proporciona las mejores recuperaciones al disminuir las pérdidas por la eliminación de la limpieza por GPC y de una de las concentraciones del extracto.
- Los herbicidas ácidos únicamente presentan recuperaciones aceptables con el método mini Luke con ajuste de pH antes del reparto, ya que se reparten así en los disolventes apolares, y, por tanto, es el método escogido para estos analitos.
- Se obtienen peores recuperaciones para las muestras de paja, porque presentan más interferencias que las de grano, pero los resultados son más parecidos en los dos métodos escogidos, que por tanto, son los más robustos.
- Los dos métodos multiresiduo de extracción de 37 herbicidas en grano y paja escogidos, ha sido validados hasta 250 µg/kg, proporcionando adecuadas recuperaciones y precisión, según las recomendaciones europeas.

4.-Ensayos de Disipación de 12 Herbicidas en Campo

Las cinéticas de orden 1 y 2 no ajustan bien los datos de disipación de los herbicidas en el campo, ya que, en general, la primera ignora los residuos que permanecen en el suelo, mientras que la segunda los magnifica. Son las cinéticas bifásicas, DFOP y HS, las que los predicen mejor. El comportamiento bifásico es típico de los ensayos en campo debido a que la fracción de herbicida disponible disminuye con el tiempo al hacerse más lentos los procesos de difusión y adsorción, lo que también hace que disminuya su degradación.

Los valores de DT_{50} y DT_{90} hallados son, en general, inferiores a los publicados, debido a que la disipación es siempre mayor en el campo que en el laboratorio al producirse conjuntamente todos los fenómenos de disipación. La persistencia de algunos herbicidas es elevada, sobre todo para los herbicidas neutros, debido probablemente a las condiciones climáticas en que se han llevado a cabo los ensayos, y al tipo de suelo característico de esta zona, con escaso contenido en coloides.

Los años en que se realizan los ensayos son de escasas precipitaciones, con una media de 500 mm. Los tratamientos se llevan a cabo en abril, y los meses siguientes son calurosos y con escasas precipitaciones, lo que provoca la rápida disipación de todos los herbicidas, debido principalmente a procesos influidos por la temperatura, como la fotólisis o la volatilización incrementados por la baja adsorción de los herbicidas en este suelo al contener escasos coloides. Sin embargo, aquellos herbicidas que son persistentes, mantienen cantidades residuales durante mucho más tiempo debido a que, la baja humedad y escasa materia orgánica, no favorecen los procesos de degradación microbiológicos, muy importantes en la disipación lenta de los herbicidas. Esto explica la elevada persistencia del Trialato, que permanece después de 480 días y el elevado valor de DT_{90} para el Flamprop (155-129 días) que se encuentra en el 1^{er} y 2^{do} ensayo.

El Trialato, la Pendimetalina, y el Flamprop, muestran el mismo patrón de disipación fuerte durante los dos ensayos por su elevada volatilización en el suelo del ensayo, con mucha arena y pocos coloides, pero son persistentes por su limitada solubilidad, poca

movilidad, y adsorción debida a la baja humedad. El Isoproturon y la Terbutrina, sin embargo, se ven afectados por las condiciones meteorológicas y se degradan más rápidamente en el 2^{do} ensayo ya que llovió más después de realizar el tratamiento. Su persistencia es moderada, porque la baja humedad no favorece la degradación microbiana, aunque no están demasiado adsorbidos.

En el 3^{er} ensayo se observa que aquellos herbicidas que se aplican en forma de ésteres sufren mayores pérdidas en el primer día de tratamiento respecto de los que se aplican en forma de sales, ya que éstas no son volátiles y permanecen en el suelo, a diferencia de los ésteres volátiles. El mayor problema que presentan las sales es su potencial lixiviación, pero no está favorecida al registrarse muy pocas precipitaciones en el primer mes. Después de 24 h desde el tratamiento, los ésteres y las sales se hidrolizan a sus correspondientes ácidos y fenoles no volátiles, permaneciendo en el suelo susceptibles de degradarse.

En general, los herbicidas aplicados en el 3^{er} ensayo no son persistentes, y se degradan totalmente durante el verano, permaneciendo algo más el MCP, debido a que se ha aplicado en la dosis más alta. La única excepción es el Diclofop, ya que en las condiciones de este suelo no se favorecen los procesos de degradación microbiológicos, lo que aumenta su persistencia.

No se presentan datos para el Fenoxaprop p etil y el Mefenpir dietil porque, al ser su proporción en el producto comercial muy baja, solamente se detectan en los primeros días del ensayo, obteniéndose muy pocos puntos para un ajuste adecuado de los modelos.

Se obtienen resultados negativos en todas las muestras de grano y paja, no detectándose ninguno de los herbicidas aplicados en el campo. Este resultado puede ser debido a que los herbicidas se disipan antes en el campo, no acumulándose en las plantas, o bien a que son metabolizados por ellas.

Los herbicidas Trialato, Flamprop, Pendimetalina, Terbutrina e Isoproturon resultan muy persistentes en las condiciones agronómicas de uso y aplicación, y los riesgos de contaminación por acumulación de los herbicidas en los suelos de las estepas cerealistas pueden ser importantes. Sin embargo los Fenoxiácidos, muy usados para malas hierbas de hoja ancha en esta zona, se disipan adecuadamente sin dejar residuos en el suelo en el momento de la cosecha.

5.-Análisis de Muestras de Suelo sujetas al Programa de las Estepas Cerealistas

Con el análisis de residuos de herbicidas en muestras de suelo procedentes de zonas sujetas al Programa de Ayudas Agroambientales de las Estepas Cerealistas, se da cumplimiento a este programa y se protege el hábitat de la Avutarda.

Entre los años 2002-2004 se encuentran residuos de Clortoluron, Isoproturon, Diflufenican Terbutrina y Trialato, normalmente en valores superiores al LMR aconsejado para suelos, 0,05 mg/kg.

En este amplio muestreo de fincas agrícolas de cereal sujetas a este programa, los residuos detectados corroboran los resultados obtenidos en los ensayos en campo, ya que el Isoproturon, el Trialato y la Terbutrina, se encuentran entre los herbicidas más persistentes.

ANEXO

PUBLICACIONES

Los trabajos que han surgido de la presente Memoria han sido presentados y publicados en:

Publicaciones en Revistas Internacionales

- C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, M. Sanz. *Orthogonal array optimization of a multiresidue method for cereal herbicides in soils*. **J. Chromatogr. A**, 1180 (2008) 10.
- C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza. *Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples*. **J. Chromatogr. A**, 1131 (2006) 11.
- C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, J. Atienza. *Study of different parameters affecting the derivatization of acidic herbicides with trimethylsulfonium hydroxide to make them suitable for gas chromatography analysis*. **J. Chromatogr. A**, 1125 (2006) 244.

Comunicaciones a Congresos

- C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, M. Sanz. *Orthogonal array optimization of an herbicide multiresidue method in soils*. **IX International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field** (Mallorca, España, 5-7 Octubre 2007).
- C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza. *Comparison of QuEChERS method with other classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples*. **11^{as} Jornadas de Análisis Instrumental** (Barcelona, España, 15-17 Noviembre 2005).
- C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, J. Atienza. *Study of different parameters affecting the derivatization of acidic herbicides with TMSH to make them suitable for GC analysis*. **11^{as} Jornadas de Análisis Instrumental** (Barcelona, España, 15-17 Noviembre 2005).
- C. Díez, P. Marinero, J. Atienza. *Estudio estadístico del efecto matriz en el análisis multiresiduo de herbicidas en suelos*. **III Congreso Virtual Iberoamericano de Calidad en Laboratorios Agroalimentarios** (2005).
- Díez C, Calvo C, Marinero P, Atienza J. *Study of the matrix interferences of different soils in the multiresidue analysis of herbicides by GC-MS*. **IV Congreso de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines**. (Madrid, España, 5-7 Octubre 2004).
- C. Díez, P. Marinero, C. Calvo, J. Atienza, M. Sanz, A. Alonso. *Validation of the multiresidue method for the determination of herbicides in soils of barley crops by GC-MS*. **25th International Symposium on Chromatography** (Paris, Francia, 4-8 Octubre 2004).
- P. Marinero Díez, C. Díez García, J. Atienza del Rey. *Validation of an herbicide multiresidue chromatographic method*. **3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques** (Almería, España, 19-21 Noviembre 2003).

- C. Díez, J.M. Pérez, P. Marinero, J. Atienza. *Multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography for monitoring herbicides in soils of barley crops. An evaluation of the use of different SPE sorbents.* **VIII Internacional Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field** (Coruña, España, 21-24 Octubre 2003).
- C. Díez, P. Marinero, J. Atienza. *Simultaneous determination of herbicides in soil of barley crops by GC-AED analysis.* **10^{as} Jornadas de Análisis Instrumental** (Barcelona, España, 26-29 Noviembre 2002).
- J. Atienza, P. Marinero, C. Díez, C. Calvo. *Cálculo del valor de la incertidumbre asociada a los resultados de los procedimientos de análisis.* **10^{as} Jornadas de Análisis Instrumental** (Barcelona, España, 26-29 Noviembre 2002).

Study of different parameters affecting the derivatization of acidic herbicides with trimethylsulfonium hydroxide to make them suitable for gas chromatography analysis[☆]

C. Díez^{a,*}, E. Barrado^b, P. Marinero^a, J. Atienza^a

^a *Laboratory of Physico-Chemical Analysis, ITACyL, Agrarian Technological Institute of “Castilla y León”, Ctra. Burgos, km. 119, 47071 Valladolid, Spain*

^b *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Valladolid, Prado de la Magdalena s/n, 47005 Valladolid, Spain*

Received 27 February 2006; received in revised form 18 May 2006; accepted 19 May 2006

Available online 19 June 2006

Abstract

In this study, an orthogonal array design was applied to know the way different parameters affected the derivatization of some herbicides that are commonly applied in the soils. Herbicides formulated as esters have been reported to rapidly hydrolyse, in contact with soil, to their corresponding acids and phenols. What involves is that both forms need to be monitored. Acidic herbicides and phenols cannot be detected by gas chromatography (GC) due to their polarity and low volatility that cause peak asymmetry. Therefore, masking of these polar groups by eliminating the active hydrogen atom with derivatization to their corresponding esters/ethers is needed in order to yield products that possess enhanced volatility and improved GC properties. A lot of derivatization reagents have been proposed but trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) was selected due to its easy and quantitative formation of methyl esters/ethers. It was observed that the addition of TMSH promoted not only esterification of acids/phenols but *trans*-esterification of the original non-hydrolyzed remaining esters to their corresponding methyl ones. As a result, methyl esters/ethers were the final product of both reactions. Different parameters were studied in the statistical design for both TMSH promoted reactions: type of solvent, pH, temperature and time of incubation. The amount of derivatization reagent was calculated to be high enough to ensure the complete derivatization of all compounds present in the sample. The reaction medium was shown as an important factor. The formation of some methyl esters/ethers decreased with increasing time and temperature because *trans*-esterification, being an equilibrium where the formation of smaller structures is promoted, was not enough shifted. However, the statistical analysis revealed that only the pH of the solution played an important role during the derivatization process. The presence of the anionic form of the acids appeared to be essential for derivatization, being diminished in strong acidic conditions. In addition, pre-heating was shown not to improve derivatization reaction, being easily carried on in the injector port of the GC system. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Herbicides; Trimethylsulfonium hydroxide; Orthogonal array design; Derivatization

1. Introduction

Acidic herbicides are widely used for control of broad-leaved weeds and other vegetation because they are relatively inexpensive and are very potent even at low concentrations [1]. They are mainly applied on crops of cereals, such as wheat and barley, in the post-emergence phase. The determination of acidic herbicides in soils is of concern because they have harmful effects

on the microflora of the soil when they are not degraded quickly enough [2].

Acidic herbicides consist of several families of compounds that are related by similarities in biological activity and chemical properties, which influence the way they are extracted and analyzed. These families of compounds are derivatives of acidic functional groups including benzoic acid (dicamba), acetic acid [2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA)], propanoic acid [dichlorprop, diclofop, fenoxaprop p and 2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propanoic acid (MCPP)], picolinic acid (cloparylid) and pyridinecarboxylic acid (fluroxypyr) among others [1].

[☆] Presented at the 11th Meeting on Instrumental Analysis, Barcelona, 15–17 November 2005.

* Corresponding author. Tel.: +34 983410456.

E-mail address: diegarci@itacyl.es (C. Díez).

Acidic herbicides can be applied in the form of free acids, salts or esters [3]. Previous studies have shown that in the environment, acidic herbicides formulated as esters undergo fast hydrolysis, on the order of 24–48 h, depending on pH and other conditions and in the presence of vegetable tissues and soil bacteria yielding the corresponding free acids [4–6]. Therefore, they are generally present as the corresponding acids and most frequently exist in ionized form at most environmental pH values [1]. The analyst, therefore, must either evaluate the herbicides in both the ester and hydrolyzed acid forms, or convert all components present to their free acids before analysis. For example, some analytical methods specify a strong base hydrolysis of any residual esters before conversion of the acids to methyl esters for gas chromatography (GC) [1]. However, this approach is unsuitable for multi-class pesticide residue analysis because other analytes will be destroyed under such strong conditions. To avoid this loss, a unique multi-residue extraction and a simultaneous analysis for both esters and their corresponding free acids is intended.

The acidic compounds, because of their polar nature, suffer from peak asymmetry and tailing in the GC stationary phases. Masking of these acidic hydrogens by derivatization to their corresponding esters is essential in order to yield products with enhanced volatility that can undergo analysis by GC [7]. The typical reactions of derivatization of phenoxyacids are *trans*-esterification, esterification, silylation, alkylation and extractive and pyrolytic alkylation [8]. Among the different derivatization methods, silylation is considered unsatisfactory for trace-level analysis because the sensitivity generally achieved with the silyl derivatives is not high enough [7]. For alkylation or haloalkylation a very extensive list of reagents exists among which diazomethane, alkyl and haloalkyl halides, alcohols and halogenated alcohols are the most common ones [9]. Diazomethane is the most frequently used derivatization agent for phenoxy acids [7]. It is applied in US Environmental Protection Agency (EPA) Methods 515.3 and 8151 for the determination of chlorinated acids in drinking water, and water, soil and waste samples, respectively. Nevertheless, the whole sample preparation procedure required is highly laborious and time-consuming. Besides, due to hazard risks regarding toxicity, carcinogenicity and the danger of explosions, alternative routes are eagerly sought.

It is essential for a derivatization technique that well defined reaction products are formed with the derivatizing agent in a reasonable time and in sufficiently high and reproducible yields [10]. The formation of methyl esters/ethers is particularly preferred, because they can be easily prepared and have reasonably short GC retention times [11]. A further class of pyrolytic alkylating reagents (hydroxides and salts of trimethylphenylammonium, tetramethylammonium, trimethylanilinium hydroxide and trimethylsulfonium hydroxide) provides an efficient methylation by pyrolysis of the previously formed salts of nucleophiles, e.g. carboxylic acids and phenols.

The most useful reagent of this type now appears to be TMSH ((CH₃)₃SOH), a very powerful pyrolytic alkylation reagent [12]. Trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) was introduced in 1979 as a mild methylating agent for acidic organic molecules and

served as a methyl group donor [13]. The reagent solution in methanol is strongly basic and stable for months with negligible decomposition when stored below 10 °C [12]. It can be used in two ways, i.e. to methylate free acids by pyrolysis of the salt in the heated injection port of a GC, or to effect base-catalyzed *trans*-esterification of other esters [13]. In some of these applications, samples were hydrolysed to the free acids prior to esterification, although it is now realized that the same reagent can catalyse *trans*-esterification of other esters directly as part of relatively simple procedures for preparing methyl esters [14].

TMSH method provides some benefits compared to other methylating procedures. One great advantage is simplification of the sample preparation without needing extraction or additional treatments. Removal of excess reagent is not required, as in other derivatization reactions, because the only by-products of this reaction are dimethylsulphide (b.p. 37 °C), and methanol that elute with the solvent peak and do not disturb the chromatographic separation of analytes. In addition, TMSH is better than other pyrolytic alkylating reagents, since their salts are found to decompose at lower temperatures (approximately 200 °C) [14]. In conclusion, this reaction is very elegant and convenient, because it is just necessary to add the reagent to the sample solution with little or no work-up and it reacts very rapidly [13,15].

The aim of the present study is the evaluation and optimization of TMSH methylation for the analysis of acidic herbicides and phenols (Table 1) in agricultural soils of barley crops. Optimization can be achieved either by the trial and error method, the one factor at a time method or by systematic methods. In recent years, a systematic method called factorial design has been used very efficiently, especially when the number of variables to be tested is large and the interactions between the variables are important. One obvious disadvantage of the factorial designs is the large number of experiments required when several variables are examined. However, the number of the experiments can be considerably reduced by the use of fractional factorial designs, such as orthogonal array designs. They are a sophisticated time and cost-saving testing strategy that draws an orthogonal array to pinpoint areas where variations may be reduced [16].

Taguchi parameter design [17,18] that uses orthogonal array designs, introduces, in addition, the concept of the signal-to-noise ratio to evaluate the variation of the response around the mean value due to experimental noise, which makes the method robust against uncontrollable variability [19]. Derivatization can be the major source of error in quantitative chromatographic analysis, the main problem being the production of background noise mainly from impurities from the derivatization agent [20]. However, it is difficult to introduce noise levels in a derivatization reaction because it will depend on matrix interferences extracted and yielding the same methylated products as analytes. In addition, the use of TMSH provides cleaner chromatograms because its excess is totally decomposed in the injector and samples are analyzed with a mass spectrometer (MS) detector in the selective selected ion monitoring (SIM) mode. As a result, no noise factor was introduced in these experiments and only an orthogonal array design was developed.

Table 1
Chemical characteristics of selected analyzed herbicides

No.	Compound	Structural group	MF	MW	pK _a	Compound + TMSH	MF	MW	Retention time (min)	Target Ion
1	2,4-D	Phenoxyacid	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221.0	2.7	2,4-D methyl	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235.0	8.91	199
2	Bromoxynil	Nitrile	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	276.9	3.9	Bromoxynil methyl	C ₈ H ₅ Br ₂ NO	290.9	9.05	291
3	Bromoxynil octanoate	Nitrile	C ₁₅ H ₁₇ Br ₂ NO ₂	403.0		Bromoxynil octanoate	C ₁₅ H ₁₇ Br ₂ NO ₂	403.0	11.96	127
4	Clopyralid	Pyridine	C ₆ H ₃ Cl ₂ NO ₂	192.0	2.3	Clopyralid methyl	C ₇ H ₅ Cl ₂ NO ₂	206.0	8.12	147
5	Dicamba	Benzoic acid	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221.0	1.9	Dicamba methyl	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235.0	8.21	203
6	Dichlorprop p	Phenoxypropionic	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235.1	3.0	Dichlorprop p methyl	C ₁₀ H ₁₀ Cl ₂ O ₃	249.1	8.60	162
7	Diclofop	Aryloxyphenoxypropionic	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	327.2	3.6	Diclofop methyl	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	341.2	12.58	253
8	Diclofop methyl	Aryloxyphenoxypropionic	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	341.2						
9	Fenoxaprop p	Aryloxyphenoxypropionic	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	333.7		Fenoxaprop p methyl	C ₁₇ H ₁₄ ClNO ₅	347.7	14.31	347
10	Fenoxaprop p ethyl	Aryloxyphenoxypropionic	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	361.8		Fenoxaprop p ethyl	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	361.8	14.57	288
11	Flamprop	Arylalanine	C ₁₆ H ₁₃ ClFNO ₃	321.7	3.7	Flamprop methyl	C ₁₇ H ₁₅ ClFNO ₃	335.7	11.65	105
12	Flamprop isopropyl	Arylalanine	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363.8		Flamprop isopropyl	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363.8	11.72	105
13	Fluroxypyr	Pyridine	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃	255.0	2.9	Fluroxypyr methyl	C ₈ H ₇ Cl ₂ FN ₂ O ₃	269.0	10.26	209
14	Ioxynil	Nitrile	C ₇ H ₃ I ₂ NO	370.9	3.9	Ioxynil methyl	C ₈ H ₅ I ₂ NO	384.9	10.73	385
15	Ioxynil octanoate	Nitrile	C ₁₅ H ₁₇ I ₂ NO ₂	497.1		Ioxynil octanoate	C ₁₅ H ₁₇ I ₂ NO ₂	497.1	14.03	127
16	MCPA	Phenoxyacid	C ₉ H ₉ ClO ₃	200.6	3.1	MCPA methyl	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214.6	8.43	214
17	MCPA tioethyl	Phenoxyacid	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂ S	244.7		MCPA tioethyl	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂ S	244.7	9.84	244
18	MCPP	Phenoxypropionic	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214.6	3.8	MCPP methyl	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₃	228.6	8.16	169
19	MCPP isocetyl	Phenoxypropionic	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₃	326.5		MCPP isocetyl	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₃	326.5	10.81	169

Retention times and quantification ions of the selected studied herbicides after derivatization. Acidic herbicides are shown as their methyl esters/ethers.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All herbicide standards were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Organic solvents intended for extraction, were at least HPLC grade and acidification with 1% acid was prepared by adding 0.1 ml of acetic or phosphoric acid to 9.9 ml of organic solvent. TMSH purum 0.25 M in methanol was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and stored at 4 °C.

2.2. Sample preparation

Individual stock standard solutions (2000 mg/l) were prepared in acetone and stored in the dark at –20 °C. They were kept for 2 h at ambient temperature previously to their use. Working standard mixtures in acetone, containing 10 mg/l of each pesticide were prepared by dilution.

Acidic herbicides were divided in two groups, those present in their acidic form and those that are also esterified. These esters were called “original” in order to differentiate them from the methyl esters produced after derivatization (except for diclofop methyl, $n = 8$, which had the same original and derivatized ester). Due to dual methyl ester formation, the same orthogonal array design was developed separately for the acidic herbicides (named “acid matrix”) and for the original esters (named “ester matrix”) in order to know which form the methyl ester came from and the way factors affected both esterification and *trans*-esterification reactions.

All experiments were carried out with standards diluted in the tested solvent at a concentration of 250 µg/l in order to avoid the possibility of finding matrix derivatized interferences.

2.3. GC–MS

An Agilent Technologies 6890N Network GC System Chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with an Agilent Technologies 7683 Series Splitless Injector and an Agilent Technologies 5973 Quadrupole Mass Selective Detector operated in the SIM mode was used. A J & W Scientific, DB-17 (30 m × 0.25 mm I.D.), 0.25 µm film thickness column, was employed with helium (99.999% purity) as carrier gas at a constant flow of 1 ml/min. The oven temperature was maintained at 60 °C for 1 min and then programmed at 22 °C/min to 290 °C, held for 4.55 min. Injector temperature was set at 250 °C and the transfer line temperature at 280 °C. Splitless injection volume was 1 µl.

3. Results and discussion

3.1. Methyl ester spectra

After the acquisition of the total ion chromatogram of a mixture of herbicide standards in acetone in scan mode, peaks were identified by their mass spectra. Some methyl ester herbicide spectra could not be found in the National Institute of Standards

and Technology, USA (NIST) library and they were searched by analyzing the acidic herbicide standards after being derivatized. In general, methyl ester spectra showed the same degradation product ions as the corresponding acidic herbicide but the heaviest ion had shifted 14 amu (being the result of adding –CH₂ to the carboxylic acid or phenol). Available methyl ester standards were purchased to ensure that TMSH reaction yielded the corresponding methyl derivatives of acidic herbicides by comparing their mass spectra and retention time.

TMSH methylation of carboxylic acids provided methyl esters while phenols (nitrile herbicides: bromoxynil, $n = 2$; and ioxynil, $n = 14$) could be identified from the total ion current chromatogram after derivatization as their methyl ethers.

The most abundant ion that showed no evidence of chromatographic interference, and the highest signal-to-noise ratio, was taken for quantification purposes (data is shown in Table 1). In some cases, both methyl and original esters had the same quantification (target) ion (flamprop, $n = 11, 12$; and MCP, $n = 18, 19$). Methyl esters had lower retention times than heavier esters of the same acid.

3.2. Optimization of operational variables

Optimization of the process with an orthogonal array design implies the use of a strategically designed experiment which deliberately introduces changes in order to: (i) identify factors affecting the procedure; and (ii) estimate the factor levels yielding an optimum response. Previous knowledge of the variables, past experience and intuition are very helpful in arranging the variables and levels of the experiment because orthogonal array designs only cover a predefined region [16].

Acetone, acetonitrile and ethyl acetate, sometimes at acidic pH, are the most usual organic solvents employed in the extraction of a large number of herbicide residues belonging to different groups [21–23]. Acidic herbicides are reported in most cases to be extracted at low pH conditions that suppress the ionization of acids and make them neutral and more apt to be extracted with an organic solvent [1,6,11,21,24]. As a result, organic solvents alone, slightly and strongly acidified (added 1% acetic acid and 1% phosphoric acid, respectively) were selected as reaction media. Subsequently, final extract derivatization reactions were affected by pH values, which have been reported to play an important role in the process [7]. Investigating the effect of pH on derivatization was essential because the reason of finding low herbicide recoveries could be a wrong derivatization, not an incomplete extraction.

The direct injection of solutions of the analytes and the derivatization reagent (TMSH) into the hot injection port of the GC has been reported [9]. For some weak acids deprotonation and thermally decomposition of the resulting salts after derivatization have been reported to occur simultaneously in a heated GC injector [8], meanwhile other authors recommend pre-heating in an oven in a closed sample vial previously to injection [15]. In order to evaluate the usefulness of pre-heating, standard mixtures were incubated for 5–30–45 min at three different temperatures: 40 °C (recommended maximum heating temperature in the TMSH label), 70 °C, both maintained in an oven, and 20 °C,

Table 2
Factors and levels for the optimization experiment

Notation	Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A	Solvent	Acetone	Ethyl acetate	Acetonitrile
B	Time of incubation (min)	5	30	45
C	Temperature of incubation (°C)	20	40	70
D	pH	–	1% acetic acid	1% phosphoric acid

kept constant in an incubation chamber to simulate the absence of pre-heating.

Consequently, the following variables were selected: temperature and time of incubation, solvent and pH (composition of reaction mixture). Three levels for each control factor instead of two were chosen (see Table 2) to detect any quadratic or non-linear relation between the factors and the output variable, and to obtain information over wider ranges of the variables.

Previously, the optimum quantity of TMSH was studied and 100 µl of a solution of TMSH 0.25 M in methanol added to 500 µl standard solutions were shown enough to provide a high excess of derivatizing reagent and to ensure the complete derivatization of all compounds present in the sample.

The total peak area (TPA) value, defined as the total sum of peak areas, was used as variable to optimize. No calibration was necessary because the formation of peaks as high as possible was the objective and only areas were used for calculations. Two output variables were chosen to be optimized due to dual methyl ester formation and the separately orthogonal array designs for acidic and original ester herbicides. Total methyl ester peak area (TMEPA) was calculated in both matrices to study methyl ester formation meanwhile, total original ester peak area (TOEPA) was only evaluated in the ester matrix to know the amount of remaining non-*trans*-esterified original esters.

Table 2 shows the level of control factors used in this experiment. Four control factors at three levels contain eight degrees of freedom, and can be fitted to the L₉(3⁴) orthogonal array which provides the greatest amount of information from the minimum number of experiments and allows to separate the effect of each factor on the output variable in terms of mean response (regular analysis). The nine different trials resulting from this design were duplicated in order to calculate the residual error, so a total number of 18 standard solutions were derivatized and analyzed by GC–MS to determine the corresponding TPA values as described above. The order the experiments were developed was previously randomized. The design matrix that indicates the combination of control factor levels to be tested is shown in Table 3.

Table 3
Experimental L₉(3⁴) orthogonal array

Trial	Control factors and levels				TMEPA (×10 ⁻⁵)		TOEPA (×10 ⁻⁵)
	A	B	C	D	Acids	Esters	Esters
1	1	1	1	1	69.3	95.6	63.7
					76.0	140.1	67.5
2	1	2	2	2	106.8	37.1	419.7
					115.5	32.6	412.6
3	1	3	3	3	13.8	9.0	503.4
					12.4	7.4	450.2
4	2	1	2	3	11.4	9.3	480.8
					12.3	7.4	448.1
5	2	2	3	1	89.3	101.0	79.4
					83.3	92.2	70.9
6	2	3	1	2	91.2	52.2	491.1
					117.6	45.6	494.3
7	3	1	3	2	108.9	42.7	543.5
					105.4	48.9	480.9
8	3	2	1	3	14.3	5.9	510.8
					13.0	6.0	543.6
9	3	3	2	1	110.6	208.1	66.5
					104.8	207.0	68.7

Total methyl ester peak area (TMEPA) has been determined for each trial and for both acid and ester herbicides matrix. Total original ester peak area (TOEPA) has also been determined for each trial in the ester herbicides matrix.

3.3. Derivatization reactions

3.3.1. Esterification with TMSH

The first reaction step was the formation of trimethylsulfonium salts by deprotonation of the acidic analyte with the strongly basic TMSH at room temperature. By heating, these salts thermally decomposed to yield methyl derivatives and dimethyl sulphide (Fig. 1.1).

3.3.2. *trans*-Esterification with TMSH

Esters can be converted to the corresponding methyl esters by a simple *trans*-esterification. *trans*-Esterification is the displacement of the alcohol portion of an ester by another alcohol. Reaction with TMSH was shown not to be a real *trans*-esterification although an ester is converted into another, because a first saponification in a strong basic environment occurred



Fig. 1. (1) Methylation of acids by pyrolysis of the salt formed from reaction with TMSH and (2) saponification of the ester in basic media to yield the anion and subsequent methylation of acids by pyrolysis of the salt formed from reaction with TMSH.

[21]. Saponification is the hydrolysis of an ester under basic conditions to form an alcohol and the salt of the acid. This salt is subsequently decomposed to the methyl ester by heat (Fig. 1.2).

3.4. Optimization of the methyl esters formation efficiency

Table 3 shows the design matrix and the TMEPA and TOEPA data obtained by duplicate for each of the nine experiments. For the regular analysis, an analysis of variance (ANOVA) table with pooled errors was calculated from these experimental data in order to identify individual sources of variation and to calculate the contribution of each factor to the response variation (Table 4). Diclofop ($n=7, 8$) was eliminated from calculations in the ester matrix because its original and methyl esters were the same and it was not possible to know the evolution of its corresponding methyl ester peak with the different parameters studied. Fenoxaprop p methyl ($n=9$) was also eliminated from calculations in the acid and ester matrices due to its instability in basic media which could lead to wrong general results.

ANOVAs of the TMEPA and TOEPA for both matrices (Table 4) revealed that factor D (pH) contributed by the highest percentage to the variability of the signal (93.78% for methyl ester formation, 78.56% for methyl ester conversion and 97.04% for original ester permanence). Although very small, contribution made by the other variables for methyl ester *trans*-esterification was the only one that could not be neglected. In both the cases of methyl ester formation and permanence of original esters, the rest of factors were negligible indicating that there were no significant differences (at 95% confidence level) among the levels tested.

The pH of the solution during both esterification and *trans*-esterification processes has been shown to play an important role. The presence of the anionic form of the acids was essential for the formation of the trimethylsulfonium salts as well as for the previous saponification in *trans*-esterification. Both esterification and *trans*-esterification reactions were enhanced in a strong basic environment provided by the addition of TMSH that yielded a solution pH value of 9. However, the presence of 1% acids neutralized this strong basic TMSH media, and as a result, anionic forms of acids were not promoted and methylation yields decreased. A solution containing 1% of acetic acid had a pH value of 6 after adding TMSH meanwhile the strongest phosphoric acid decreased TMSH solution pH value till 2.

Data in Table 3 clearly showed the effect of pH. All experiments developed at the same pH conditions had near TMEPA and TOEPA values regardless to the solvent, incubation time and temperature used.

The contribution of the residual error to the TMEPA and TOEPA variability (6.22%, 2.89% and 2.96%, respectively) indicates the goodness of the experimental design used. As a rule, if such a contribution is smaller than 10–15%, the variance of the experimental data can be explained by the effect of factors and interactions. In consequence, it can be asserted that the experimental design used in this work took into account all the variables affecting the response, and the levels tested were fit for the purpose.

Fig. 2 shows the effects of control factor levels on the output variable. It can be observed that control factors different than pH had a slight influence on the TMEPA and TOEPA value, and a change in their level produced very small variation in the conversion or permanence efficiency.

Table 4

Pooled ANOVA for the regular analysis of total methyl ester peak area (TMEPA) in the acid matrix and TMEPA and total original ester peak area (TOEPA) in the ester matrix

Variation source	A: solvent 2	B: time of incubation 2	C: temperature of incubation 2	D: pH 2	Residual	Total 8
TMEPA (acid matrix)						
Sum of squares ($\times 10^4$)	3.81	3.77	5.41	301.80		319.30
Variance ratio (F) ^a				129.20		
Pool	Yes	Yes	Yes	No	Yes	
Pooled sum of squares				294.40	19.90	319.30
Contribution (%) ^b				93.78	6.22	100.00
TMEPA (ester matrix)						
Sum of squares ($\times 10^4$)	47.94	56.20	36.40	566.51		718.05
Variance ratio (F) ^a	19.61	22.99	14.89	231.75		
Pool	No	No	No	No	Yes	
Pooled sum of squares	45.50	53.75	33.95	564.07	20.78	718.05
Contribution (%) ^b	6.34	7.49	4.73	78.56	2.89	100.00
TOEPA (ester matrix)						
Sum of squares ($\times 10^4$)	69.00	1.58	70.98	6778.50		6960.01
Variance ratio (F) ^a				280.03		
Pool	Yes	Yes	Yes	No	Yes	
Pooled sum of squares				6754.25	205.75	
Contribution (%) ^b				97.04	2.96	100.00

2 and 8 are the degrees of freedom.

^a Critical variance ratio for a 95% confidence level is 19.0.

^b Contribution is defined as $100 \times (\text{pooled sum of squares}/\text{total sum of squares})$.

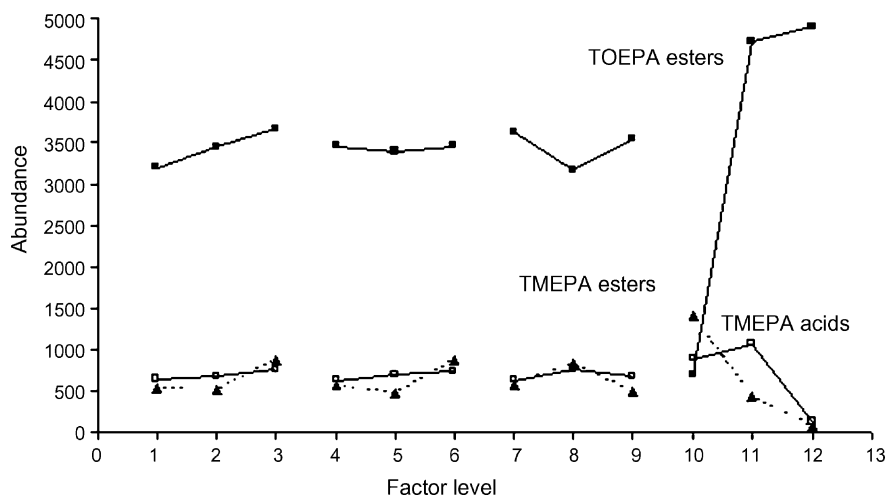


Fig. 2. Comparison of the effect of the interaction of control factors on the mean response for: original remaining esters (■), and methyl esters (□) acid matrix; (▲) ester matrix).

Maximum methylation of acidic herbicides was obtained for D₂, (pH) 1% acetic acid (pH value of 6). The other three factors had not a statistically significant effect (at 95% confidence level) on the signal ratio; however, level A₃ (solvent), acetonitrile; B₃ (incubation time), 45 min; and C₂ (incubation temperature), 40 °C, gave a slightly higher ratio. A slightly acidic environment gave the highest methyl ester formation but results were very close to those obtained in a basic medium. The very low methyl ester peak areas obtained with 1% of phosphoric acid, suggest that TMSH reaction was more influenced by very acidic pH values and the reaction worked properly from a neutral to a basic pH.

Fig. 2 also shows the effect of control factors on *trans*-esterification. TMEPA esters and TOEPA esters representations were obviously found to be opposite, the highest the methyl ester conversion, the smallest the permanence of remaining original esters. Both esterification and *trans*-esterification methyl ester formation were affected in the same way by pH being very diminished at strongly acidic pH values, although it seemed that *trans*-esterification needed a stronger basic media and did

not work properly at a pH value of 6 (1% acetic acid) as esterification.

Figs. 3 and 4 show chromatograms of standards of acids and original esters respectively, derivatized in acetone slightly acidified (with acetic acid) because it was the pH finally selected. Methyl esters are present in Fig. 3 due to the methylation of acids. However, very low methyl esters and high original remaining esters can be found in Fig. 4 due to low *trans*-esterification at this pH value.

3.5. Esterification and *trans*-esterification percentages

Esterification and *trans*-esterification yields were only studied for those herbicides that could be simultaneously present in their acid and ester forms in the environment. Only acetone was used because solvents were shown in the previous section to have no significant or very little contribution to the reactions and a strongly acidified environment was not tested because it nearly avoided them. Results for both reactions are shown in Table 5.

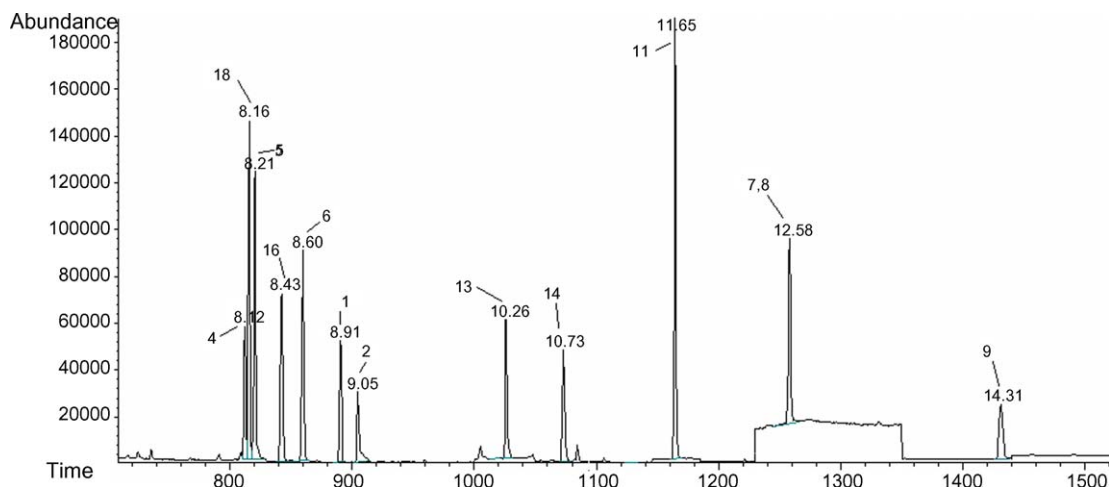


Fig. 3. Chromatogram of acids derivatized in a slightly acidic environment (acetone with 1% acetic acid). The methyl esters formation by esterification can be observed. Peaks are numbered as herbicides in tables.

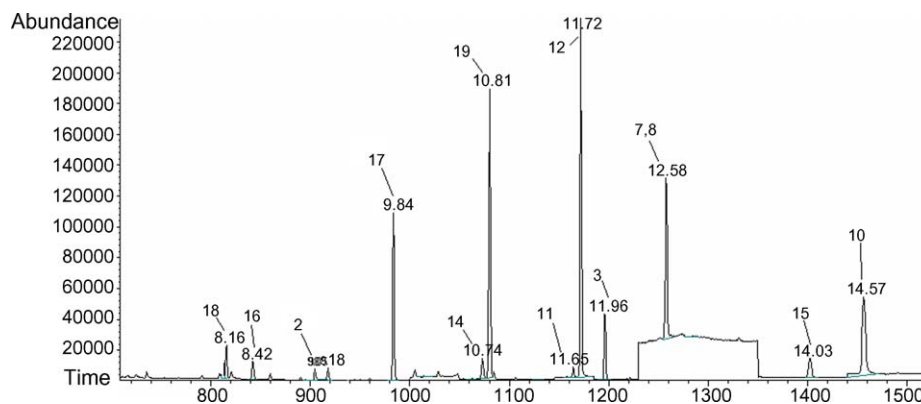


Fig. 4. Chromatogram of original esters derivatized in a slightly acidic environment (acetone with 1% acetic acid). The permanence of original esters can be observed as well as the low methyl esters formation by *trans*-esterification. Peaks are numbered as herbicides in tables.

In the case of esterification, the standards of acidic herbicides diluted in the tested solvent at a concentration of 250 $\mu\text{g/l}$ and directly derivatized in the injection port of the GC, were compared to their corresponding non-derivatized methyl ester standards diluted at the same concentration. Fenoxaprop p methyl could not be purchased and, therefore, data was not available.

As previously discussed, methyl ester yields were lower at a slightly acidic environment than at a basic environment. Most of the herbicides that belonged to phenoxy acid family have very similar structures and yielded high percentages of methylated derivatives. However, herbicides with different structures suffered from different processes. For instance, nitrile herbicides (bromoxynil, $n=2$ and ioxynil, $n=14$) were hydrolyzed to carboxylic acids, RCO_2H , via the amide, RCONH_2 with the strong

basic environment provided by TMSH and heat. As a result, lower methyl ester yields were found at a basic medium than at a slightly acidic one when compared with the non-derivatized standards.

In the same way, *trans*-esterification yields were studied by comparing derivatized original ester standard solutions of 250 $\mu\text{g/l}$ with methyl and original non-derivatized ester standards at the same concentration to know the percentage of methylated esters formed and the amount of original non-derivatized remaining esters.

Generally, higher methyl ester percentages were found in acetone compared to the same derivatization in acidified solvent because saponification was more promoted (Fig. 4). Basic media degradation was proved for both nitrile herbicides (bro-

Table 5

Percentages of esterification and *trans*-esterification reactions (average of three repetitions) in a basic (acetone) and slightly acidic (added 1% acetic acid, HAc) environment

No.	Compound	Esterification product	Ac		Ac + 1% HAc		<i>trans</i> -Esterification product	Ac		Ac + 1% HAc	
			%	RSD	%	RSD		%	RSD	%	RSD
1	2,4-D										
2	Bromoxynil	Bromoxynil methyl	18.7	8.5	34.4	9.3	Bromoxynil methyl	11.6	5.0	6.5	11.8
3	Bromoxynil octanoate					Bromoxynil octanoate			59.3	6.3	
4	Clopyralid										
5	Dicamba										
6	Dichlorprop p										
7	Diclofop	Diclofop methyl	82.9	6.2	76.4	3.4	Diclofop methyl	99.7	6.4	110.6	4.8
8	Diclofop methyl										
9	Fenoxaprop p	Fenoxaprop p methyl					Fenoxaprop p methyl				
10	Fenoxaprop p ethyl					Fenoxaprop p ethyl			91.8	3.5	
11	Flamprop	Flamprop methyl	92.1	2.1	84.0	1.5	Flamprop methyl	23.9	7.5	5.1	8.6
12	Flamprop isopropyl					Flamprop isopropyl	71.5	4.5	91.8	3.7	
13	Fluroxypyr										
14	Ioxynil	Ioxynil methyl	17.5	2.5	20.9	0.5	Ioxynil methyl	11.3	5.6	7.2	5.4
15	Ioxynil octanoate					Ioxynil octanoate			40.2	6.5	
16	MCPA	MCPA methyl	90.7	6.7	69.1	9.6	MCPA methyl	85.8	0.1	21.7	6.7
17	MCPA tioethyl					MCPA tioethyl			96.9	5.2	
18	MCPP	MCPP methyl	106.0	1.0	93.4	6.1	MCPP methyl	67.7	6.9	16.5	8.0
19	MCPP isoctyl					MCPP isoctyl			95.9	4.1	

Table 6
Linearity coefficients and *t*-test of linearity for derivatized analytes in solvent calibration with acetone slightly acidified (added 1% acetic acid, HAc) and matrix-matched calibrations with four different types of soil

No.	Compound	Linearity coefficient					<i>t</i> _{cal} (test of linearity)				
		Ac + 1% HAc	Soil 1	Soil 2	Soil 3	Soil 4	Ac + 1% HAc	Soil 1	Soil 2	Soil 3	Soil 4
1	2,4-D	93.8	95.5	97.7	94.2	94.6	16.1	22.1	43.6	18.6	17.2
2	Bromoxynil	96.2	95.2	94.9	93.5	95.9	26.4	20.7	19.4	24.2	15.3
3	Bromoxynil octanoate	99.8	97.2	93.5	97.9	93.6	532.0	35.7	15.3	15.5	46.9
4	Clopyralid	96.2	96.2	94.8	95.7	96.6	26.3	26.6	19.2	29.4	23.4
5	Dicamba	97.5	97.2	95.8	97.4	95.6	39.4	35.2	24.1	22.5	38.5
6	Dichlorprop p	96.0	95.4	95.8	96.2	95.3	24.8	21.9	23.7	21.1	26.2
7	Diclofop										
8	Diclofop methyl	99.0	94.8	97.0	96.1	95.8	100.8	19.1	32.8	23.8	25.4
9	Fenoxaprop p	97.8	97.9	95.6	94.4	94.1	45.7	48.3	22.9	17.1	18.0
10	Fenoxaprop p ethyl	97.1	98.4	94.9	94.6	95.7	34.5	63.0	19.7	23.4	18.4
11	Flamprop	96.7	94.5	95.2	93.9	94.9	30.2	18.2	21.0	19.6	16.5
12	Flamprop isopropyl	99.3	96.6	94.9	97.0	96.7	137.1	29.6	19.7	30.7	32.9
13	Fluroxypyr	94.4	94.8	96.8	94.1	96.4	17.7	19.2	31.5	27.8	17.0
14	Ioxynil	96.3	96.7	93.9	92.8	93.5	27.0	30.1	16.3	15.5	13.9
15	Ioxynil octanoate	95.0	97.7		95.1	99.2	20.0	43.8		126.9	20.4
16	MCPA	98.2	94.2	95.6	96.2	95.1	57.1	17.2	22.7	20.4	26.5
17	MCPA tioethyl	97.5	96.5	97.3	99.7	97.3	40.6	28.2	36.7	37.7	307.2
18	MCPA	96.9	95.2	93.9	96.5	98.2	32.5	21.0	16.4	54.2	28.3
19	MCPA isocetyl	98.5	95.4	97.3	98.2	93.5	64.8	21.9	36.9	15.3	54.2

moxynil, $n=2$ and ioxynil, $n=14$) yielding no or very little methyl ester percentages. A little *trans*-esterification percentage was also found for flamprop isopropyl ($n=12$) because being a big molecule is thought to suffer from esteric interactions (Fig. 4).

Fenoxaprop ($n=9, 10$) could only be found in acidified solvent experiments because its benzoxazole ring was cleaved in a basic environment. In addition, fenoxaprop p methyl was only formed from the acidic herbicide derivatization and not from the *trans*-esterification of its ethyl ester (Figs. 3 and 4). Small esters (as ethyl formulations) did not *trans*-esterify because the reaction, being an equilibrium where the formation of smaller esters is promoted, was not enough shifted.

3.6. Calibration and determination

Experiments with solvent calibration standards prepared in acetone (1% of acetic acid) with derivatized acids and esters were carried out to check if the conversion of acids/phenols and esters to their methyl esters/ethers was quantitative. In order to demonstrate that the optimized methylation conditions were also appropriate in the presence of matrix interferences, matrix-matched standard calibrations were also prepared by adding standards to 900 μ l of a blank extract of different soils extracted with acetone slightly acidified (1% of acetic acid). In order to know the applicability of the methylation in different matrices, four soils were chosen due to their different characteristics. The composition of these soils was: soil 1, sand 46%, silt 37%, clay 17%, pH (H₂O) 8.5, organic matter 0.7%; soil 2, sand 57%, silt 31%, clay 12%, pH (H₂O) 7.9, organic matter 0.8%; soil 3, sand

34%, silt 3%, clay 63%, pH (H₂O) 8.2, organic matter 1.7%; and soil 4, sand 16%, silt 24%, clay 60%, pH (H₂O) 6.0, organic matter >2.5%. Previously to the spiking procedure, an analysis of the soil blank samples was carried out, verifying the absence of herbicides.

Linear calibration curves were obtained for all compounds over the whole range (0.05–0.5 μ g/ml) tested at five levels. The analytical results are shown in Table 6. The fit of the calibration function was plotted and inspected visually but it was also numerically tested in two different ways. Linearity coefficients were calculated with the slope and its deviation ($r=(1-S_b/b) \times 100$). A value above 95 is usually considered linearly fitted for chromatography. The *t*-test of linearity was also carried out: the calculated *t*-values (*t*_{cal}) are shown in Table 6. These results were compared with the theoretical value (*t*_{th}) at $\alpha=0.05$ and 3 degrees of freedom (5 calibration levels), i.e. *t*_{th} = 3.182. Application of *t*-test revealed linear fit for all calibration curves since the calculated *t*-value were higher than the theoretical value and the null hypothesis (non-linear fit) was rejected. Ioxynil octanoate suffered from a strong matrix effect in soil 2, being its peak completely masked and, therefore, data could not be shown.

4. Conclusions

The statistical analysis revealed that only pH was important in methyl ester formation. Both esterification and *trans*-esterification methyl ester formation were affected in the same way by pH being very diminished at strong acidic pH values, although it seemed that *trans*-esterification needed a stronger

basic medium and did not work properly at a pH value of 6 (1% acetic acid) as esterification. Phosphoric acid could not be used because it attacked the chromatographic column and derivatization was very inhibited in such an acidic environment, therefore, making impossible the analysis of residues even if properly extracted.

As a result, any organic solvent acidified with 1% acetic acid was suitable for methylation with TMSH and as, pre-heating was shown not to improve derivatization yield, it was just necessary to add the derivatizing reagent to the sample vial and methylation was completely carried on in the injector port of the GC system.

Acknowledgements

The authors wish to thank professor José María Andrés from the Department of Organic Chemistry in the Faculty of Sciences at University of Valladolid, for his aid in understanding reaction mechanisms, and to the Agrarian Technological Institute of “Castilla y León” (ITACyL) for financial support.

References

- [1] M.J.M. Wells, L.Z. Yu, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 237.
- [2] M.J. Santos-Delgado, E. Crespo-Corral, L.M. Polo-Díez, *Talanta* 53 (2000) 367.
- [3] Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, Part I, General Inspectorate for Health Protection, Sixth ed., Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, 1996.
- [4] W.L. Budde, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 1.
- [5] J.L. Tadeo, C. Sanchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 175.
- [6] S. Marchese, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 393.
- [7] M.I. Catalina, J. Dalluge, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 153.
- [8] M. Rompa, E. Kremer, B. Zygmunt, *Anal. Lett.* 37 (2004) 3299.
- [9] A. Zapf, H.J. Stan, *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 83.
- [10] J. Tekel, J. Kovacicová, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 291.
- [11] E. Macutkiewicz, M. Rompa, B. Zygmunt, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (2003) 1.
- [12] K. Yamauchi, T. Tanabe, M. Kinoshita, *J. Org. Chem.* 44 (1979) 638.
- [13] W. Butte, *J. Chromatogr.* 261 (1983) 142.
- [14] W.W. Christie, in: W.W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology*, Oily Press, Dundee, 1993, p. 69.
- [15] J.M. Halket, V.G. Zaikin, *Eur. J. Mass Spectrom.* 10 (2004) 1.
- [16] H.B. Wan, W.G. Lan, M.K. Wong, C.Y. Mok, Y.H. Poh, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 255.
- [17] P.J. Ross, *Taguchi Techniques for Quality Engineering*, McGraw-Hill Book Company, New York, 1988.
- [18] G. Taguchi, *System of Experimental Design*, vol. I–II, ASII, New York, 1991.
- [19] E. Barrado, F. Prieto, M. Vega, F. Fernández-Polanco, *Water Res.* 32 (1998) 3055.
- [20] A. Scheyer, S. Morville, P. Mirabel, M.A. Millet, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1226.
- [21] C. Sanchez-Brunete, J.L. Tadeo, *Quim. Anal.* 15 (1996) 53.
- [22] K. Mastovska, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 259.
- [23] E. Kremer, M. Rompa, B. Zygmunt, *Chromatographia* 60 (2004) 169.
- [24] J. Nolte, R. Kruger, *Fresenius J. Anal. Chem.* 365 (1999) 610.

Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples[☆]

C. Díez^{a,*}, W.A. Traag^b, P. Zommer^b, P. Marinero^a, J. Atienza^a

^a *Laboratory of Physic-Chemical Analysis, ITACyL, Agrarian Technological Institute of “Castilla y León”, Ctra. Burgos, km.119, 47071 Valladolid, Spain*

^b *Group of Pesticides & Contaminants, Analytical Services and Development, RIKILT, Institute of Food Safety, Building 123, Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen, The Netherlands*

Received 21 November 2005; received in revised form 7 July 2006; accepted 10 July 2006

Available online 9 August 2006

Abstract

An acetonitrile/partitioning extraction and “dispersive solid-phase extraction (SPE)” method that provides high quality results with a minimum number of steps and a low solvent and glassware consumption was published in 2003. This method, suitable for the analysis of multiple classes of pesticide residues in foods, has been given an acronymic name, QuEChERS, that reflects its major advantages (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe). In this work, QuEChERS method, which was originally created for vegetable samples with a high amount of water, was modified to optimise the extraction of a wide range of herbicides in barley. Then, it was compared with known conventional multi-residue extraction procedures such as the Luke method, which was simplified and shortened by eliminating the Florisil clean-up (mini Luke) and the ethyl acetate extraction, which involves a subsequent clean-up by gel permeation chromatography (GPC) and which is the official extraction method used by some of European authorities. Finally, a simple acetone extraction was carried out to check the differences with the other three methods. Extracts were analysed by gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC–TOF/MS) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). Mini Luke was significantly more effective for the extraction of non-polar and medium-polar compounds, but the best recoveries for polar compounds were achieved by QuEChERS and ethyl acetate methods. QuEChERS was the only method that provided an overall recovery value of 60–70% for non-, medium- and polar compounds, with some exceptions due to co-eluted matrix interferences. Clean-up by dispersive SPE was effective and did not differ so much with ethyl acetate extracts considering that QuEChERS clean-up step is much easier and less time-consuming. As a conclusion, it resulted to be the most universal extraction method by providing a well-defined phase separation without dilution and achieving acceptable recoveries in average including the extraction of the always difficult acidic herbicides. However, recoveries were not as good as required for validation purposes suggesting that residues are prone to strong matrix interactions in dry samples as barley and further method adaptation incrementing solvent strength, extraction time or more acidic or basic conditions is needed in order to achieve a complete extraction.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: QuEChERS; Herbicide residues; Barley; Extraction

1. Introduction

A multitude of xenobiotic compounds are released worldwide every year. Among these, pesticides play an important role, as their use cannot be neglected because of the enormous benefits in agricultural outputs. However, owing to their occurrence and

possible toxicity in the environment and foods, it is important to monitor their residues being nowadays a priority objective in the sanitary control of fruits and vegetables (Directive 98/82/EC).

Multi-residue methods are responses to the high demand for pesticide residue analysis providing an increase in the productivity of laboratories, as well as decreasing the cost of analyses [1]. These methods require universality of the isolation and clean-up procedure and, as far as possible, unification of the conditions of the chromatographic separation [1]. Acetone (Luke method [2], German DFG-S19 method [3]), acetonitrile (Canadian PMRA method [4], the California Department of Food and Agriculture methods, the Florida Department of Agriculture and

[☆] Presented at the 11th Meeting on Instrumental Analysis, Barcelona, 15–17 November 2005.

* Corresponding author. Tel.: +34 983410456.
E-mail address: diegarci@itacyl.es (C. Díez).

Consumer Service methods), ethyl acetate (Sweden [5], Spain [6]) and methanol (Alder LC–MS method [7]) are the most usual organic solvents employed in the extraction of a large number of pesticide residues from foods by mechanical shaking or homogenisation often in mixtures with water, dichloromethane or light petroleum sometimes at acidic pH [8–10].

In the early 1960s, pesticide residue methods focused on the recovery of the non-polar organochlorine pesticides. By using the Mills method [11], pesticides were extracted from non-fatty foods with acetonitrile. Water and salts were added to the acetonitrile extract, and the pesticides were subsequently partitioned into non-polar solvents, such as light petroleum or hexane. Thus, water and polar matrix components, such as sugars and salts, were separated from the extract in a convenient clean-up step.

When more polar pesticides, such as organophosphates, were introduced, new methods were required. Within the US Food and Drug Administration (FDA) during the 1970s, the Mills method was replaced by the Luke method [2], which used acetone rather than acetonitrile in the initial extraction step. The Luke method, which is still in use today, is the base of currently pesticide multi-residue methods used most often for surveillance and compliance monitoring of foods, risk assessment studies, and other surveys and routine analyses in non-fatty samples such as fruits and vegetables [12]. It consists of a liquid–liquid partitioning step with non-polar solvents to remove the co-extracted water [13] and, on the addition of sodium sulphate (Na_2SO_4), to recover the polar pesticides otherwise lost in the aqueous phase.

The ethyl acetate method [14] was introduced as an alternative to Luke procedure for the extraction of non-fatty samples because it was faster, simpler, cleaner and gave very good recoveries. All its advantages made it the official extraction method used by some European authorities. It involves an ethyl acetate extraction, a subsequent addition of Na_2SO_4 , and a final clean-up by gel permeation chromatography (GPC) [15] or Florisil. It not only increases the extraction of polar compounds as compared to the Luke method but also extracts more polar interferences from the matrix.

Anastassiades et al. published in 2003 a method that provided high quality results with a minimum number of steps and a low solvent and glassware consumption [16]. The method was given an acronymic name, QuEChERS, that reflected its major advantages (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe). Sample preparation is always the major bottleneck in the complete analytical procedure for the determination of pesticide residues in food products. The QuEChERS multi-residue procedure omits or replaces many complicated analytical steps commonly employed in traditional methods by easier ones. The original procedure consists of extracting the homogenised sample by hand-shake or Vortex with the same amount of acetonitrile in order to have a final extract, concentrated enough without the need of a solvent evaporation step. An advantage of extracting with acetonitrile rather than acetone is that acetonitrile separates more easily from water with the addition of a proper combination of salts (anhydrous magnesium sulphate, MgSO_4 , and sodium chloride, NaCl) which provides a well-defined phase separation without dilution with hazardous non-polar

organic solvents as well as it achieves high recoveries including rather polar pesticides [9]. Anhydrous MgSO_4 is a much more effective drying agent and its hydration is highly exothermic (around 40°C) but not sufficient to volatilise or degrade herbicides, enhancing the extraction and helping to verify that water has been removed from solution [10,17]. After centrifugation, which provides a perfect physical separation of phases, clean-up and removal of residual water is performed simultaneously by using a rapid procedure called dispersive solid-phase extraction (SPE), in which a primary secondary amine (PSA) sorbent and more anhydrous MgSO_4 are mixed with the sample extract. Dispersive SPE is based on the SPE methodology, but the sorbent is directly added to the extract without conditioning the clean-up being easily carried out by shaking and centrifugation. PSA is a weak anion exchanger sorbent with the ability to remove fatty acids, sugars and some other matrix co-extractives that form hydrogen bonds [9].

Many laboratories are currently evaluating QuEChERS method, among them, the Dutch Inspectorate for Health Protection in Amsterdam is validating the extraction of 400 pesticides. The results obtained may contribute to the validation of this procedure, a legal step that is essential before a new method can be accepted as a reliable substitute for the existing official procedures.

The main disadvantage of QuEChERS versus other common methods is that the 1 g sample/ml final extract concentration is lower than the concentrated extracts obtained with most of the traditional procedures. To achieve the desired limits of quantification (LOQ) in modern analytical systems, the final extract has to be concentrated in which case $1/2 \mu\text{l}$ splitless injection provides the necessary degree of sensitivity. However, if concentration is not intended because it can lead to losses, programmable temperature vaporisation (PTV) system, allowing the injection of big volumes of sample (20–100 μl), is typically needed. In a PTV injector, sample is injected at temperatures below the boiling point of the extract solvent, and the temperature of inlet port is held at a low value while solvent vapour elimination occurs via the split exit [9,18]. After the venting step, the inlet is rapidly heated and analytes are transferred onto the front part of the analytical column. However, in the analysis of real samples, a higher injection volume does not necessarily translate into lower detection limits because co-extracted matrix compounds may represent the limiting source of noise [10]. When pesticides at low concentrations are injected, the active sites are filled by pesticides containing hydroxy, amino, phosphate, and other relatively polar groups, and this interaction decreases the efficiency of analyte introduction into the GC column [10]. In the presence of matrix, the active sites in the glass are filled by matrix components, and this interaction gives larger compound peaks. The most widely used approach to account for this matrix interference phenomenon and to avoid a wrong quantification is the use of matrix-matched calibration [19,20] as recommended in [21].

In this study, the QuEChERS method was modified to optimise the extraction of a wide range of herbicides in barley. Then, it was compared with well-known conventional multi-residue extraction procedures such as the mini Luke and the ethyl acetate method as well as with an acetone extraction, to check whether

Table 1
Physic-chemical and analytical characteristics of selected herbicides

No.	Compound	Structural group	M.F.	log Kw	M.W.	Analysis
1	Trifluralin	Dinitroaniline	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	4.83	335.3	GC–TOF/MS
2	Triallate	Thiocarbamate	C ₁₀ H ₁₆ Cl ₃ NOS	4.60	304.7	GC–TOF/MS
3	Terbuthylazine	Chlorotriazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	3.21	229.7	GC–TOF/MS
4	MCPA tioethyl	Phenoxyacid	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂ S	4.05	244.7	GC–TOF/MS
5	Metribuzin	Triazinone	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	1.60	214.3	GC–TOF/MS
6	Prosulfocarb	Thiocarbamate	C ₁₄ H ₂₁ NOS	4.65	251.4	GC–TOF/MS
7	Terbutryn	Methylthiotriazine	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	3.65	241.4	GC–TOF/MS
8	Pendimethalin	Dinitroaniline	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	5.18	281.3	GC–TOF/MS
9	Flamprop isopropyl	Arylalanine	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃		363.8	GC–TOF/MS
10	Diclofop methyl	Aryloxyphenoxypropionic	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	4.58	341.2	GC–TOF/MS
11	Bromoxynil octanoate	Nitrile	C ₁₅ H ₁₇ Br ₂ NO ₂	5.40	403.0	GC–TOF/MS
12	Carfentrazone ethyl	Triazolone	C ₁₅ H ₁₄ O ₃ N ₃ Cl ₂ F ₃		398.0	GC–TOF/MS
13	Diffenican	Anilide	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	4.90	394.3	GC–TOF/MS
14	Mefenpyr diethyl	Herbicide safener	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₄	3.83	373.2	GC–TOF/MS
15	Ioxynil octanoate	Nitrile	C ₇ H ₃ I ₂ NO	0.89	497.1	GC–TOF/MS
16	Fenoxaprop ethyl	Aryloxyphenoxypropionic	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	1.83	361.8	GC–TOF/MS
17	Difenzoquat methyl sulfate	Quaternary ammonium	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	0.65	360.4	LC–ESI (+)-MS/MS
18	Clopyralid	Pyridine	C ₆ H ₃ Cl ₂ NO ₂	–1.91	192.0	LC–ESI (+)-MS/MS
19	Florasulam	Triazolopyrimidine	C ₁₂ H ₈ F ₃ N ₅ O ₃ S		359.0	LC–ESI (+)-MS/MS
20	Metoxuron	Phenylurea	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	1.60	228.7	LC–ESI (+)-MS/MS
21	Cyanazine	Chlorotriazine	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	2.10	240.7	LC–ESI (+)-MS/MS
22	Triasulfuron	Triazinylsulfonyleurea	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₅ S	1.10	401.8	LC–ESI (+)-MS/MS
23	Thifensulfuron methyl	Triazinylsulfonyleurea	C ₁₁ H ₁₁ N ₅ O ₆ S ₂	0.20	373.4	LC–ESI (+)-MS/MS
24	Imazamethabenz methyl	Imidazolinone	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₃	1.54	274.3	LC–ESI (+)-MS/MS
25	Chlorsulfuron	Triazinylsulfonyleurea	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	–0.99	357.8	LC–ESI (+)-MS/MS
26	Amidosulfuron	Pyrimidinylsulfonyleurea	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₇ S ₂	1.63	369.4	LC–ESI (+)-MS/MS
27	Tribenuron methyl	Triazinylsulfonyleurea	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₆ S	–0.44	395.4	LC–ESI (+)-MS/MS
28	Chlortoluron	Phenylurea	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ O ₄ S	2.50	212.7	LC–ESI (+)-MS/MS
29	Methabenzthiazuron	Urea	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	2.64	221.3	LC–ESI (+)-MS/MS
30	Isoproturon	Phenylurea	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	2.50	206.3	LC–ESI (+)-MS/MS
31	Isoxaben	Amide	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₄	3.94	332.4	LC–ESI (+)-MS/MS
32	Linuron	Phenylurea	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	3.00	249.1	LC–ESI (+)-MS/MS
33	Fenchlorazol ethyl	Herbicide safener	C ₁₂ H ₈ Cl ₅ N ₃ O ₂		403.5	LC–ESI (+)-MS/MS
34	Bifenox	Nitrophenyl ether	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO ₅	4.50	342.1	LC–ESI (+)-MS/MS
35	Tralkoxydim	Cyclohexene oxime	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	2.10	329.4	LC–ESI (+)-MS/MS
36	Pyridate	Pyridazine	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ S	3.00	378.9	LC–ESI (+)-MS/MS
37	Fluroxypyr	Pyridine	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃	–1.24	255.0	LC–ESI (–)-MS/MS
38	Bentazone	Unclassified	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	2.28	240.3	LC–ESI (–)-MS/MS
39	Dicamba	Benzoic acid	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	–0.15	221.0	LC–ESI (–)-MS/MS
40	MCPA	Phenoxyacid	C ₉ H ₉ ClO ₃	2.75	200.6	LC–ESI (–)-MS/MS
41	2,4-D	Phenoxyacid	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	2.58	221.0	LC–ESI (–)-MS/MS
42	MCPP	Phenoxypropionic	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	0.10	214.6	LC–ESI (–)-MS/MS
43	Dichlorprop p	Phenoxypropionic	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	1.77	235.1	LC–ESI (–)-MS/MS

their reported advantages were achieved. Extracts were analysed by gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC–TOF/MS) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). All herbicides intended for barley were selected in order to develop a multi-residue method available to analyse any herbicide residue present in this type of samples. Herbicide physic-chemical characteristics and mode of analysis are shown in Table 1.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All herbicide standards were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). All organic solvents, intended for extrac-

tion, were at least HPLC grade and were provided by Labscan (Dublin, Ireland). Formic acid (HCOOH, content >98%) was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland).

Bulk quantities of anhydrous MgSO₄ and Na₂SO₄, obtained from Merck (Darmstadt, Germany), were heated to 500 °C for more than 5 h to remove phthalates and any residual water prior to their use in the laboratory. PSA sorbent (40 μm particle size) was obtained from Varian (Harbor City, CA, USA).

2.2. Standards

Individual stock standard solutions (2000 mg/l) were prepared in acetone and stored in the dark at –20 °C. They were kept for 2 h at ambient temperature prior to their use. Working standard mixtures in acetonitrile, containing 10 mg/l for each

pesticide and diluted to 1 mg/l, were used for spiking barley samples at a 250 µg/kg level for comparison purposes. Calibration standards were prepared by dilution in acetonitrile. The internal standards were prepared by dissolving [²H₅] simazine and polychlorinated biphenyl (PCB)-198 in acetone to make stock solutions of 2000 mg/l and diluted in acetonitrile to 1 mg/l before addition to samples.

2.3. Barley samples

Ecologically grown barley samples were purchased in order to ensure the absence of herbicide residues. Then, they were ground and freeze-dried till extraction. Fortified samples were prepared by spiking 100 g of blank barley samples, previously unfrozen at ambient temperature, with different known volumes of working standard solution and with the first internal standard ([²H₅]simazine). The barley was then homogenised by mechanical shaking for 30 min, and the bulk of the solvent was left to evaporate at ambient temperature and controlled by weight.

2.4. Procedures

2.4.1. QuEChERS extraction

QuEChERS was designed for samples with more than 75% moisture, and it had to be adapted to barley. Spiked samples (2.5 g) were taken instead of 10 g (sample amount in the original procedure) being the other 7.5 g filled up with water in order to add the necessary moisture and to make pores in the sample more accessible to the extraction solvent. A 50 ml PTFE vessel was used because it was not attacked by organic solvents and nothing stuck on it. Ten milliliters of acetonitrile were then added to the sample, and the mixture was hand-shaken for 1 min. Afterwards, 4 g of anhydrous MgSO₄ and 1 g of NaCl were added, and the mixture was hand-shaken for another minute to provide a well-defined phase separation after 5 min of centrifugation at 2500 rpm. Two aliquots, with/without PSA clean-up, were separated for different analysis. The first aliquot was cleaned-up with 25 mg of PSA and dried with 150 mg of MgSO₄ by mixing them in a Vortex. After centrifugation, 1 ml extract was recovered and filtered through a 0.45 µm PTFE filter prior to the addition of 60 µl of a 1 mg/l PCB-198 solution (second internal standard) for GC-TOF/MS analysis. The second aliquot was also filtered and added to the second internal standard, but it was directly analysed by LC-MS/MS without PSA clean-up because it has been reported to retain acidic herbicides [9].

In the original QuEChERS procedure the same amount of sample and solvent is used, but because of adaptation to barley, 2.5 g of sample were diluted in 10 ml of acetonitrile. As the other three methods concentrate the extracts, they were diluted to an equivalent concentration for comparison purposes.

2.4.2. Routine Dutch acetone method

This method is a miniaturised and streamlined version of the Luke method [12]. In this Dutch approach, 5 g of spiked barley and 10 ml of water were placed in a 250 ml PTFE cen-

trifuge tube and blended using a probe blender for 1 min with 20 ml of acetone. Then, 20 ml of dichloromethane and 20 ml of light petroleum were added, and the sample extract was blended again (partitioning step) for only 20 s. Enough Na₂SO₄ to bind the water was added. After centrifugation at 2500 rpm for 5 min and filtration through a glass funnel filled with quartz wool and more Na₂SO₄, a 28 ml portion of the upper layer was concentrated at 35 °C and 0.5 bar of nitrogen till near dryness. Then, the second internal standard was added to the concentrated extract with acetonitrile until a QuEChERS equivalent concentration of 0.25 g/ml.

2.4.3. Ethyl acetate extraction

This method has been described elsewhere [6,18]. In the Dutch adaptation, 5 g of spiked barley and 10 ml of water were mixed in a 100 ml brown glass tube and kept for 2 h for swelling adequately at room temperature. Then the mixture was horizontally shaken for 4 h at 200 rpm with 50 ml of ethyl acetate and a glass ball to ease the mixture. Enough Na₂SO₄ to bind the water was added. After centrifugation for 5 min at 2500 rpm, the extract was filtered through a glass funnel filled with quartz wool and more Na₂SO₄. Twenty-five milliliters of filtered extract were recovered and concentrated at 35 °C and 0.5 bar of nitrogen and filled with cyclohexane and ethyl acetate (1:1) until a final volume of 1 ml. 0.95 ml was attained previously filtered with a 0.45 µm PTFE filter, were cleaned by GPC which removed high molecular weight compounds. The eluate was again concentrated at 35 °C and 0.5 bar of nitrogen, added to the second internal standard and filled up with acetonitrile until a QuEChERS equivalent concentration of 0.25 g/ml.

2.4.4. Acetone extraction

Five grams of barley were placed in a 50 ml brown glass tube and were mechanically shaken for 1 h with 15 ml of acetone. After centrifugation at 2500 rpm for 5 min, 10 ml of extract were recovered and concentrated until dryness at 35 °C and 0.5 bar of nitrogen. Then, the second internal standard was added to the concentrated extract and filled up with acetonitrile until a QuEChERS equivalent concentration of 0.25 g/ml.

2.5. Equipment

2.5.1. GPC

A Merck Hitachi LaChrom Pump L-7110 equipped with a Gilson Dilutor 401 ASPEC model 202 Injector (Middleton, WI, USA) and a Jasco Intelligent UV-975 Detector (Easton, MD, USA) was used. A first Envirogel methylene chloride, 150 mm × 10 mm guard column and a second Envirogel methylene chloride, 300 mm × 19 mm analytical column were employed, both supplied by Waters (Manchester, UK). The mobile phase, formed by a mixture of cyclohexane and ethyl acetate (1:1), was kept constant at 5 ml/min. A 950 µl extract volume was injected and 10 ml of eluate was recovered after the first 22 min (determined experimentally with standards), once the heaviest interfering molecules had been separated.

Table 2

Herbicide retention times, quantification ions, linearity coefficients (matrix-matched calibration) and limits of detection (LODs) for blank barley samples extracted with QuEChERS (Q) and analysed by GC–TOF/MS

No.	Compound	Retention time (s)	Target ion	Linearity coefficient	Q LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	Trifluralin	1164	306.10	97.6	1.9
2	Triallate	1169	268.10	97.2	2.2
3	Terbuthylazine	1174	214.10	97.9	1.6
4	MCPA tioethyl	1177	125.10	98.5	1.2
5	Metribuzin	1211	198.00	97.7	1.8
6	Prosulfocarb	1232	128.10	98.1	1.5
7	Terbutryn	1256	226.10	98.8	1.0
8	Pendimethalin	1362	252.00	97.3	2.1
9	Flamprop isopropyl	1481	105.10	98.7	1.1
10	Diclofop methyl	1497	253.00	98.2	1.4
11	Bromoxynil octanoate	1503	127.10	98.2	1.1
12	Carfentrazone ethyl	1522	312.10	97.7	1.8
13	Diflufenican	1532	266.10	98.6	1.1
14	Mefenpyr diethyl	1553	253.00	97.9	1.7
15	Ioxynil octanoate	1628	127.10		
16	Fenoxaprop p ethyl	1630	288.10	97.1	2.3

2.5.2. GC–TOF/MS

An Agilent Technologies 6890N Network GC System chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with an ATAS GL International Optic 3 high-performance PTV injector (Veldhoven, The Netherlands) and LECO Pegasus III time-of-flight mass spectrometer (TOF/MS) Detector (St. Joseph, MI, USA) operating in the scan mode was used. A Restek (Bellefonte, PA, USA) RTX-CL pesticides column (30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness) was employed with helium as a carrier gas at a constant flow of 1.3 ml/min (42 cm/s). The oven temperature was maintained at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min and then programmed at 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 280 $^{\circ}\text{C}$, held for 15 min. Transfer line temperature was set at 280 $^{\circ}\text{C}$.

2.5.3. LC–MS/MS

A Micromass Quattro micro 02 triple quadrupole mass spectrometer (Manchester, UK) was interfaced via electrospray ionization (ESI) to an Agilent Technologies HPLC 1100 Series chromatograph system equipped with a quaternary pump. For the LC separation, a previous Waters Xterra MS C₁₈ guard column (10 mm \times 2.1 mm, 5 μm) and a Waters Symmetry C₁₈ analytical column (150 mm \times 3 mm, 5 μm) were employed. The mass spectrometer was run in single reaction monitoring (SRM) technique detecting only one pair of selected ions (a parent and a daughter ion), which will be analysed for each pesticide at a dwell time of 50 ms. For operation in MS/MS mode, Argon 99.995% was used as collision gas with a pressure of 3.35×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 23 kV and 3 kV were used in negative and positive ionisation mode, respectively. The interface temperature was set to 350 $^{\circ}\text{C}$ and the source temperature to 120 $^{\circ}\text{C}$. Dwell times of 1 s/scan were chosen.

2.6. Analysis

2.6.1. GC–TOF–MS analysis

After the acquisition of the total ion chromatogram of a mixture of herbicide standards in acetonitrile in scan mode,

peaks were identified by their retention time and mass spectra. The identification was confirmed by comparing the relative abundances of the three ions (one quantifier and two qualifiers) of the experimental standards to known relative abundances of the US National Institute of Standards and Technology (NIST) library reference spectra. The most abundant ion that showed no evidence of chromatographic interference, and the highest signal-to-noise ratio, was taken for quantification purposes (Table 2). A GC–TOF–MS chromatogram is shown in Fig. 1.

Data processing of these kinds of full scan chromatograms without loss of mass spectrometric information could only be achieved using the data analysis peak deconvolution algorithm software. It combined peaks with different m/z values found at the same retention time and having the same shape to build the compound spectrum. With this procedure, co-eluting peaks with slightly different retention times, i.e. with one or more data points between their peak apices and/or peak shapes, were identified as different compounds.

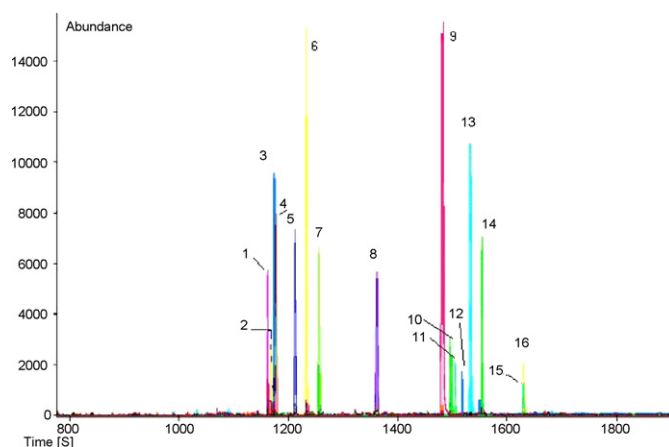


Fig. 1. Chromatogram of herbicides analysed by GC–TOF/MS. Peaks are numbered in the same way as in the tables.

Table 3
Herbicide retention times, parent ions, daughter ions, cone and collision energies, linearity coefficients (matrix-matched calibration) and limits of detection (LODs) for blank barley samples extracted with QuEChERS (Q) and analysed by LC–MS/MS

No.	Compound	Polarity	Retention time (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Cone (V)	Collision (eV)	Product ion (<i>m/z</i>)	Linearity coefficient	Q LOD ($\mu\text{g/kg}$)
17	Difenzoquat methyl sulphate	ESI+	7.43	249.00	30	35	130.00	98.3	1.3
18	Clopyralid	ESI+	9.13	192.00	30	20	146.00	97.2	
19	Florasulam	ESI+	10.06	360.25	35	20	128.87	96.7	2.6
20	Metoxuron	ESI+	10.38	229.00	30	20	72.00	97.4	2.0
21	Cyanazine	ESI+	10.84	241.30	30	18	214.00	97.2	2.2
22	Triasulfuron	ESI+	10.88	402.03	30	18	166.88	97.8	1.7
23	Thifensulfuron methyl	ESI+	10.96	388.10	25	15	166.91	97.5	1.9
24	Imazamethabenz methyl	ESI+	11.08	289.27	30	25	160.89	97.7	1.8
25	Chlorsulfuron	ESI+	11.74	358.20	30	18	140.80	98.6	1.1
26	Amidosulfuron	ESI+	11.92	370.10	20	15	260.80	98.2	1.4
27	Tribenuron methyl	ESI+	12.10	396.12	20	12	154.90	97.4	2.1
28	Chlortoluron	ESI+	12.28	213.00	30	20	72.00	97.4	2.0
29	Methabenzthiazuron	ESI+	12.49	222.28	25	15	164.92	97.1	2.3
30	Isoproturon	ESI+	12.58	207.00	30	20	72.00	97.1	2.3
31	Isoxaben	ESI+	13.42	333.00	30	20	165.00	96.5	2.7
32	Linuron	ESI+	13.46	249.00	30	20	160.00	96.2	3.0
33	Fenchlorazol ethyl	ESI+	15.26	404.00	35	20	357.80	98.5	1.2
34	Bifenox	ESI+	15.51	342.20	20	10	309.92	96.4	2.8
35	Tralkoxydim	ESI+	16.92	330.40	25	12	284.10	95.8	3.3
36	Pyridate	ESI+	18.14	207.00	60	18	103.80	70.5	23.2
37	Fluroxypyr	ESI–	10.05	253.00	15	15	195.00	98.4	1.2
38	Bentazone	ESI–	10.78	239.00	20	25	197.00	94.1	4.7
39	Dicamba	ESI–	11.47	221.00	30	10	177.00	98.5	1.2
40	MCPA	ESI–	11.56	201.00	30	15	143.00	98.8	0.9
41	2,4-D	ESI–	11.71	219.00	15	12	161.00	99.8	0.2
42	MCPP	ESI–	11.79	213.00	30	20	141.00	97.5	2.0
43	Dichlorprop p	ESI–	11.96	233.00	20	12	161.00	98.3	1.4

2.6.2. LC–MS/MS analysis

Values used for compound detection (Table 3) resulted from optimisation by means of infusion experiments of a methanolic standard pesticide mixture of 10 mg/l, in flow injection analysis (FIA) mode directly connected to MS/MS under systematically varied source parameters. The multi-class nature of the selected pesticides as well as their different acid–base properties made that 7 out of the 27 compounds analysed by LC–MS/MS presented only negative ionisation, detected as $[\text{M} - \text{H}]^-$, meanwhile the rest showed preferably positive ionisation and were detected as $[\text{M} + \text{H}]^+$. Being weak acids, the formation of the seven deprotonated phenoxy herbicides in the negative ionisation mode was expected. Only poor ionisation, or none at all, was observed when analysing compounds in the opposite mode.

One precursor and product ion, with their respective cone voltage and collision cell energy (Table 3), were selected for each compound for both quantification and qualification in order to obtain the highest response of the selected ion. The use of another transition for confirmation implied the use of more channels and it would require longer chromatographic runs.

Aliquots (250 μl) were taken from all extracts and were added to 250 μl of water, vortexed and filtered prior to their LC–MS/MS analysis. Injection volumes were 50 μl for compounds detected in a positive ionisation mode and 25 μl for those detected in the negative mode. To perform the chromatographic separation, a water:methanol (95:5) (solvent A)

and methanol:water (95:5) (solvent B), both containing 5 mM formic acid, gradient was used. Mobile phase acidification with formic acid in both water and methanol solvents was needed because of the presence of some acidic herbicides among those intended for study. For compounds detected in the positive ionisation mode (Fig. 2), the percentage of solvent B was changed as follows: 0–1 min, 20%; 1–8 min, 75%; 13 min, 100% held for 3 min; 16–16.3 min, 20% held for 5.7 min at a constant flow rate of 0.4 ml/min. For compounds detected in the negative ionisation mode (Fig. 3), the percentage of solvent B was

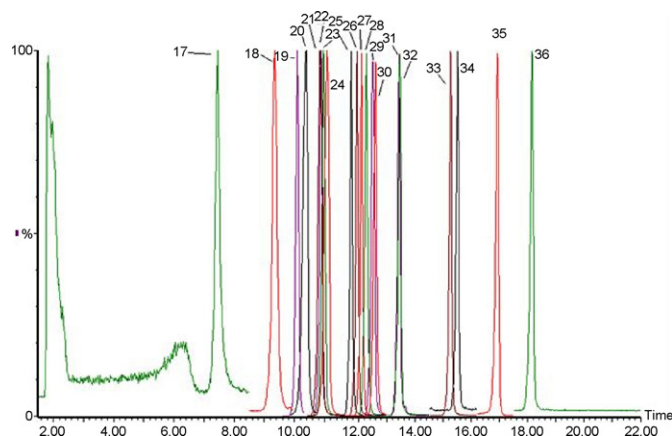


Fig. 2. Chromatogram of herbicides analysed by LC–ESI (+)–MS/MS. Peaks are numbered in the same way as in the tables.

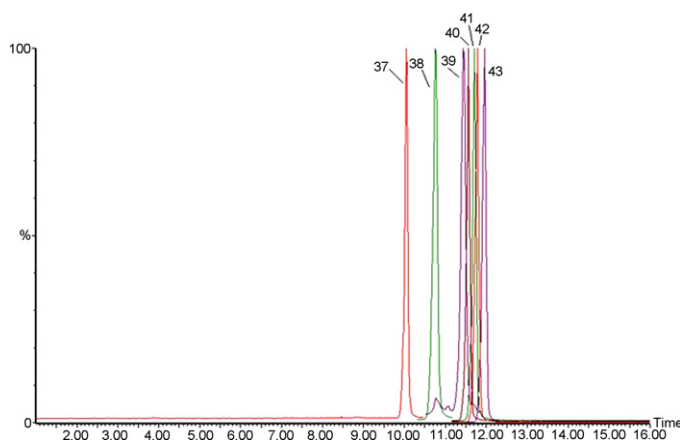


Fig. 3. Chromatogram of herbicides analysed by LC–ESI (–)–MS/MS. Peaks are numbered in the same way as in the tables.

changed as follows: 0–1 min, 20%; 1–8 min, 100%; 9–9.5 min, 20% held for 5.5 min at a constant flow rate of 0.4 ml/min.

LC/MS–MS was the preferred approach for those pesticides compatible to both analytical systems (Table 1). For instance, chlorsulfuron ($n=25$), chlortoluron ($n=28$), and isoproturon ($n=30$), sulfonyleurea herbicides, were degraded by the high temperature of the injector in GC, and, consequently, analysis by LC–MS/MS was preferred than quantifying the thermal degradation products by GC–TOF/MS.

2.7. Quantitation

The concentration of the compounds of study was determined by comparing peak areas in the sample with those found for mixtures of herbicide standards of known concentration analysed in the same conditions. The effect of the presence of substance/s in the matrix in the chromatographic determination, which affected the signal of analytes causing bias, was corrected with the use of calibration lines prepared in blank barley extracts, i.e. matrix-matched standard calibration.

In order to compensate for losses during sample processing and instrumental analysis, two internal standards were used. The first ($[^2\text{H}_5]$ simazine) was added when spiking in order to control the extraction procedure. A very little volume, not to dilute the sample, of the second one (PCB-198) was added to the vial just before analysis to control the amount of analytes passing to the column. The analyte concentrations were deduced from their response relative to that produced by this second internal standard provided that it was reliably detected without interferences.

3. Results and discussion

3.1. PTV injection

A 1.5 mm I.D. sintered glass liner was used for this type of injection. A test intended for checking the retention of compounds on this liner was carried out. Two microliters of three concentration mixtures (50–150–250 $\mu\text{g/l}$) containing all the herbicides were injected in splitless mode and compared with

a 25 μl and 50 μl PTV injection. Concentrations for these two last volumes were made equal in order to put the same amount of compounds into the column. First of all, 25 μl and 50 μl of pure acetonitrile were injected at 40 °C and 50 ml/min split flow to know the time the majority of the solvent vapour needed to leave the inlet port via the split exit, before raising the injector temperature until 300 °C at 5 °C/min to introduce the analytes into the column. The inlet pressure was 30 kPa.

As a result of the liner retention test, herbicides could be classified into three groups. The response of trifluralin ($n=1$), triallate ($n=2$), terbuthylazine ($n=3$), fenoxaprop p ethyl ($n=16$), cyanazine ($n=21$), and bifenoxy ($n=34$) was the same with the 3 tested injection volumes. Bromoxynil octanoate ($n=11$), ioxynil octanoate ($n=15$), and linuron ($n=32$) were retained in the sintered glass liner because their responses with PTV injection were lower than in splitless mode. The rest of herbicides showed an increase in response when large volumes were injected, especially important for difenzoquat methyl sulphate ($n=17$).

A 25 μl injection volume that needed a vent time of 110 s was finally chosen because it gave the required sensitivity, and most of the compounds were not retained by the liner. PTV injection was not used for difenzoquat methyl sulphate ($n=17$) and linuron ($n=32$) due to the problems encountered with the liner and, therefore, their residues were analysed by LC–MS/MS. Unfortunately, LC analysis was not possible for bromoxynil octanoate ($n=11$) and ioxynil octanoate ($n=15$), nitrile herbicides, which were only analysed by GC–TOF/MS.

3.2. Evaluation of QuEChERS method

3.2.1. Linearity and limit of detection (LOD)

The linearity of the analytical procedure was tested with a matrix-matched standard calibration prepared by adding 100 μl of the corresponding herbicide standard solutions to 900 μl of a barley blank extracted with QuEChERS.

Linear regression was used for quantification, and calibration curves were not forced through the origin. The fit of the calibration function was plotted and inspected visually, but it was also numerically tested by the use of linearity coefficients, calculated with the slope and its deviation ($r=(1-S_b/b)\cdot 100$). A value above 95 is usually considered linearly fitted for chromatography. Linear calibration curves were obtained for all compounds analysed by GC–TOF/MS and LC–MS/MS over the whole range (2.5–100 $\mu\text{g/l}$) tested at four levels, except for pyridate ($n=36$, linearity coefficient 70.5) due to co-eluted matrix interferences. The rest of compounds showed good linearity coefficients, i.e. above a value of 95, and only slightly lower in the case of bentazone ($n=38$). The analytical results are shown in Table 2 (GC) and Table 3 (LC).

The LOD, defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was estimated for spiked samples based on a signal-to-noise ratio of 3:1. Values were slightly smaller than the desired limit of quantification (2.5 $\mu\text{g/kg}$) for all herbicides analysed by GC (Table 2) and LC (Table 3), except for florasulam ($n=19$), isoxaben ($n=31$), linuron ($n=32$), bifenoxy ($n=34$), tralkoxidim ($n=35$), and bentazone ($n=28$). An unusual high value of

Table 4
Recoveries and relative standard deviations (%) for the three spiking level barley samples extracted with QuEChERS procedure

No.	Compound	10 µg/kg	RSD (n=2)	50 µg/kg	RSD (n=6)	250 µg/kg	RSD (n=6)
1	Trifluralin	108.6	7.6	81.5	4.2	74.8	1.5
2	Triallate	122.0	32.5	80.2	2.7	73.4	1.7
3	Terbuthylazine	92.0	3.1	78.9	3.6	73.1	1.5
4	MCPA tioethyl	37.2	18.2	56.2	9.2	62.9	5.7
5	Metribuzin	88.6	39.3	90.2	3.6	83.5	1.9
6	Prosulfocarb	102.4	1.1	82.5	1.9	74.8	1.7
7	Terbutryn	128.8	18.0	85.4	1.7	76.9	1.6
8	Pendimethalin	111.8	10.9	84.7	2.6	76.0	2.5
9	Flamprop isopropyl	85.4	3.6	85.1	2.4	78.9	1.1
10	Diclofop methyl	73.6	30.0	75.5	6.7	76.3	2.1
11	Bromoxynil octanoate			26.7	32.2	38.1	9.3
12	Carfentrazone ethyl	81.6	10.4	72.0	13.1	76.8	2.9
13	Diflufenican	84.8	12.7	78.5	3.6	78.0	2.1
14	Mefenpyr diethyl	113.0	19.3	82.0	2.0	76.4	1.2
15	Ioxynil octanoate						
16	Fenoxaprop p ethyl	72.6	46.4	83.9	3.8	80.3	2.1
17	Difenzoquat methyl sulphate	30.5	2.5	24.6	20.2	45.7	16.2
18	Clopyralid						
19	Florasulam	131.8	2.7	156.0	4.2	135.0	2.5
20	Metoxuron	29.3	3.3	57.2	7.7	68.8	5.5
21	Cyanazine	95.0	4.0	119.7	2.3	108.6	1.1
22	Triasulfuron	51.2	1.0	76.0	4.0	83.0	3.9
23	Thifensulfuron methyl	75.8	0.3	92.1	1.0	89.3	1.6
24	Imazamethabenz methyl	50.8	1.4	75.3	1.2	77.8	2.2
25	Chlorsulfuron	70.7	4.5	92.5	2.1	92.4	1.0
26	Amidosulfuron	65.2	6.2	85.8	1.9	83.9	1.2
27	Tribenuron methyl			38.8	4.6	41.2	4.5
28	Chlortoluron	41.3	4.7	67.6	5.3	77.2	3.2
29	Methabenzthiazuron	73.3	1.6	104.3	1.0	100.5	0.8
30	Isoproturon			19.3	39.2	49.9	13.7
31	Isoxaben			6.2	104.1	37.4	19.5
32	Linuron	7.8	31.6	61.6	5.6	71.4	3.9
33	Fenchlorazol ethyl	28.9	0.2	38.0	4.2	48.0	4.4
34	Bifenox	90.8	0.1	117.4	4.4	101.6	2.6
35	Tralkoxydim	186.8	0.8	114.9	2.0	93.1	6.1
36	Pyridate						
37	Fluroxypyr	47.1	27.7	60.2	4.1	65.6	3.3
38	Bentazone			44.2	3.5	70.7	5.9
39	Dicamba	39.4	17.9	51.0	5.2	60.7	1.7
40	MCPA	61.3	5.3	72.9	3.4	69.3	3.3
41	2,4-D	25.4	12.6	60.0	8.1	60.2	1.7
42	MCPP	35.2	9.2	65.1	3.7	63.2	4.4
43	Dichlorprop p	36.7	4.4	63.8	7.0	67.5	2.1

23.2 µg/kg was found for pyridate ($n=36$), confirming that it was strongly affected by matrix interferences and it could not be properly analysed.

3.2.2. Recoveries

The evaluation of the procedure included recovery tests for each herbicide using matrix-matched calibrations for quantification prepared with barley blanks extracted with QuEChERS. They were performed at three different concentrations: 10, 50 and 250 µg/kg. 10 µg/kg was chosen to meet recent EU legislation for baby foods (Commission of the European Communities; Directive 2003/13/EC) which is the most restrictive about pesticide residues, and 50 µg/kg because it is the most currently herbicide maximum residue level (MRL) set by the Council Directive 91/414/EEC on the placing of plant protection prod-

ucts in the market. It must be pointed out that the lowest spiking level (10 µg/kg) was only developed by duplicate because it was a first approach to evaluate the possibility of properly extracting such low concentrated samples with a 4-time diluting extraction method and no solvent concentration. Six replicates instead, were developed for both 50 and 250 µg/kg spiking levels. Results are shown in Table 4.

The dispersion of results changed with concentration, and recovery differed substantially at both the lowest and the highest concentrations. Recoveries of non-polar herbicides (compounds from 1 to 16 in Table 4) at 10 µg/kg were in the range of 70–110%, as recommended in [21], except for nitrile herbicides (not well-deconvoluted), triallate ($n=2$), MCPA tioethyl ($n=4$) and terbutryn ($n=7$). However, the highest recovery values obtained for most herbicides at this spiking level in comparison

Table 5

Linearity coefficients for matrix-matched standards prepared with barley blanks extracted with the four procedures. Slopes (b) and intervals of the slopes ($t \cdot S_b$) of the linear fit of responses in matrix-matched standards vs. responses in acetonitrile calibration.

No.	Compound	QuEChERS			EtAc			mini Luke			Ac		
		Linear coefficient	Linear fit		Linear coefficient	Linear fit		Linear coefficient	Linear fit		Linear coefficient	Linear fit	
			$b \pm t \cdot S_b$	ME		$b \pm t \cdot S_b$	ME		$b \pm t \cdot S_b$	ME		$b \pm t \cdot S_b$	ME
1	Trifluralin	97.62	1.11 ± 0.12		98.77	1.11 ± 0.09	X	99.27	1.18 ± 0.07	X	98.12	1.14 ± 0.12	X
2	Triallate	97.23	1.16 ± 0.16	X	99.60	0.94 ± 0.03	X	99.19	0.84 ± 0.07	X	99.09	0.87 ± 0.07	X
3	Terbutylazine	97.91	1.13 ± 0.08	X	99.05	1.09 ± 0.06	X	99.73	0.88 ± 0.02	X	96.49	1.09 ± 0.17	
4	MCPA tioethyl	98.51	1.11 ± 0.08	X	99.38	0.88 ± 0.03	X	99.12	1.19 ± 0.08	X	98.49	1.18 ± 0.11	X
5	Metribuzin	97.67	1.00 ± 0.11		99.15	1.03 ± 0.02	X	90.99	0.46 ± 0.17	X	98.87	1.19 ± 0.05	X
6	Prosulfocarb	98.10	1.18 ± 0.13	X	99.14	1.01 ± 0.05	X	99.08	1.16 ± 0.04	X	96.13	1.10 ± 0.20	
7	Terbutryn	98.79	1.21 ± 0.08	X	99.50	1.07 ± 0.02	X	94.39	0.20 ± 0.04	X	94.40	0.41 ± 0.08	X
8	Pendimethalin	97.34	1.15 ± 0.08	X	98.84	1.07 ± 0.06	X	95.49	0.38 ± 0.06	X	95.70	0.68 ± 0.13	X
9	Flamprop isopropyl	98.66	1.19 ± 0.04	X	99.60	0.91 ± 0.03	X	99.57	1.21 ± 0.05	X	98.40	1.26 ± 0.11	X
10	Diclofop methyl	98.22	1.04 ± 0.02	X	98.55	1.03 ± 0.09		98.87	0.83 ± 0.00	X	99.22	1.02 ± 0.01	X
11	Bromoxynil octanoate	98.19	1.33 ± 0.36		98.97	0.66 ± 0.11	X	98.67	0.58 ± 0.50		96.66	2.28 ± 0.17	X
12	Carfentrazone ethyl	97.73	1.13 ± 0.07	X	98.78	1.31 ± 0.06	X	98.20	1.29 ± 0.09	X	96.63	1.35 ± 0.17	X
13	Diflufenican	98.58	1.11 ± 0.04	X	99.10	0.95 ± 0.10		99.62	1.10 ± 0.09	X	98.40	0.97 ± 0.14	
14	Mefenpyr diethyl	97.85	1.06 ± 0.05	X	99.00	1.08 ± 0.03	X	98.61	0.77 ± 0.05	X	97.54	0.92 ± 0.09	
15	Ioxynil octanoate				98.15	0.80 ± 0.16	X	98.14	1.26 ± 0.29	X	96.95	0.80 ± 0.40	
16	Fenoxaprop ethyl	97.12	1.27 ± 0.03	X	97.99	1.02 ± 0.16		98.77	2.33 ± 0.39	X	98.63	1.64 ± 0.28	X
17	Difenzoquat methyl sulfate	98.32	12.72 ± 1.42	X	98.23	4.60 ± 1.19	X	98.57	6.21 ± 1.46	X	97.93	5.55 ± 0.53	X
18	Clopyralid	97.21	0.19 ± 0.02	X	99.82	2.15 ± 0.14	X	79.68	0.09 ± 0.06	X	74.69	0.05 ± 0.05	X
19	Florasulam	96.72	0.49 ± 0.09	X	99.69	1.83 ± 0.07	X	98.69	2.01 ± 0.22	X	99.61	2.07 ± 0.07	X
20	Metoxuron	97.40	1.46 ± 0.06	X	99.69	0.56 ± 0.03	X	98.98	0.64 ± 0.07	X	97.83	1.67 ± 0.04	X
21	Cyanazine	97.24	0.68 ± 0.10	X	99.70	1.44 ± 0.03	X	99.47	1.51 ± 0.02	X	99.00	0.74 ± 0.01	X
22	Triasulfuron	97.83	1.35 ± 0.11	X	99.27	1.35 ± 0.06	X	99.15	1.31 ± 0.07	X	98.64	1.21 ± 0.09	X
23	Thifensulfuron methyl	97.52	1.05 ± 0.12		99.38	1.03 ± 0.02	X	99.26	1.02 ± 0.02		99.80	1.06 ± 0.01	X
24	Imazamethabenz methyl	97.66	1.10 ± 0.09	X	99.75	0.81 ± 0.02	X	99.10	1.15 ± 0.07	X	97.95	1.16 ± 0.08	X
25	Chlorsulfuron	98.59	0.91 ± 0.09		99.62	1.08 ± 0.04	X	99.78	1.16 ± 0.04	X	99.31	1.09 ± 0.07	X
26	Amidosulfuron	98.19	0.98 ± 0.10		98.79	0.99 ± 0.03		98.59	0.85 ± 0.04	X	99.69	1.14 ± 0.04	X
27	Tribenuron methyl	97.39	0.67 ± 0.07	X	98.91	0.68 ± 0.04	X	97.78	0.56 ± 0.06	X	99.51	1.51 ± 0.02	X
28	Chlortoluron	97.42	1.13 ± 0.07	X	99.59	0.62 ± 0.02	X	98.98	1.30 ± 0.12	X	97.42	1.58 ± 0.09	X
29	Methabenzthiazuron	97.12	0.61 ± 0.07	X	99.67	1.48 ± 0.02	X	99.66	1.68 ± 0.02	X	99.81	1.38 ± 0.02	X
30	Isoproturon	97.13	2.92 ± 0.48	X	97.38	3.83 ± 0.65	X	99.41	0.33 ± 0.09	X	94.78	3.51 ± 0.32	X
31	Isoxaben	96.51	5.58 ± 1.25	X	95.99	7.68 ± 1.51	X	99.14	0.18 ± 0.06	X	92.79	6.81 ± 0.95	X
32	Linuron	96.21	1.11 ± 0.10	X	98.45	1.41 ± 0.01	X	99.22	0.92 ± 0.04	X	97.36	1.32 ± 0.06	X
33	Fenchlorazol ethyl	98.50	0.66 ± 0.06	X	99.87	0.76 ± 0.02	X	98.65	0.62 ± 0.02	X	99.24	0.94 ± 0.06	X
34	Bifenox	96.39	0.46 ± 0.10	X	98.18	1.52 ± 0.03	X	99.08	2.54 ± 0.20	X	98.62	1.69 ± 0.02	X
35	Tralkoxydim	95.85	1.52 ± 0.12	X	97.29	1.34 ± 0.04	X	97.54	1.62 ± 0.04	X	95.72	0.70 ± 0.15	X
36	Pyridate	70.48	0.35 ± 0.38	X	95.62	1.39 ± 0.01	X	97.11	1.55 ± 0.14	X	94.78	1.57 ± 0.20	X
37	Fluroxypyr	98.43	1.05 ± 0.16		99.16	0.71 ± 0.04	X	99.81	0.94 ± 0.08		98.08	1.48 ± 0.25	X
38	Bentazone	94.06	1.13 ± 0.11	X	93.97	1.48 ± 0.16	X	95.44	1.30 ± 0.08	X	92.32	1.35 ± 0.13	X
39	Dicamba	98.48	0.72 ± 0.27	X	96.67	0.89 ± 0.48		98.50	0.56 ± 0.19	X	95.33	0.78 ± 0.20	X
40	MCPA	98.83	0.96 ± 0.09		97.24	1.13 ± 0.27		97.50	0.92 ± 0.07	X	96.70	1.13 ± 0.12	X
41	2,4-D	99.77	0.98 ± 0.03		98.88	1.38 ± 0.09	X	98.04	1.04 ± 0.09		97.99	1.09 ± 0.09	X
42	MCPP	97.52	0.96 ± 0.11		98.13	1.00 ± 0.19		95.50	0.98 ± 0.14		94.71	1.05 ± 0.17	
43	Dichlorprop p	98.26	0.93 ± 0.08		97.65	1.18 ± 0.15	X	96.39	0.98 ± 0.16		97.65	1.07 ± 0.11	

ME (presence of matrix effect). S_b represents the deviation of slopes. t values were calculated at $\alpha = 0.05$ and 2° of freedom, i.e. $t_{th} = 4.303$.

with the other two levels and the lack of precision for some analytes (i.e. RSD > 30%, as recommended in [21]), suggests that matrix enormously affected this very low concentrated level, and a solvent concentration step is needed to achieve validation criteria. Surprisingly, medium-polar herbicides (compounds from 17 to 36 in Table 4) showed lower recoveries than those obtained for 50 and 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ levels and good precision values, except for linuron ($n=32$). This different behaviour is a consequence of the contrary effect that matrix had on GC–TOF/MS and LC–MS/MS analyses.

All average recoveries at both 50 and 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ concentration level were in the 70–110% range for the most non-polar and medium-polar analytes, being diminished for those that suffered from matrix interferences, i.e. bromoxynil octanoate ($n=11$), difenzoquat methyl sulphate ($n=17$), isoproturon ($n=30$) and isoxaben ($n=31$), and even for those well detected as MCPA tioethyl ($n=4$) and fenchlorazol ethyl ($n=33$). Florasulam ($n=19$) showed a strong matrix enhancement. Polar acidic analytes (compounds from 37 to 43 in Table 4) showed average recoveries higher than 60% for the 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ except for bentazone ($n=38$) and dicamba ($n=39$).

Differences due to analyte concentration in the two highest spiking levels were minimal in terms of recovery for nearly all analytes, and satisfactory precision values were observed except for those analytes affected by matrix interferences.

3.3. Comparison of extraction methods

3.3.1. Matrix effect

The linearity of the analytical procedures was tested with matrix-matched standard calibrations prepared by adding herbicide standards to 900 μl of a barley blank extracted with the four procedures.

Linear calibration curves (Table 5) were obtained for all compounds analysed by GC–TOF/MS and LC–MS/MS over the whole range (2.5–100 $\mu\text{g}/\text{l}$) tested at four levels, except for pyridate ($n=36$) in QuEChERS extracts and for clopyralid ($n=18$) in mini Luke and acetone extracts due to co-eluted matrix interferences. Some herbicides had linearity coefficients slightly lower than 95 in the case of mini Luke and acetone extracts (metribuzin, $n=5$; terbutryn, $n=7$; isoproturon, $n=30$; isoxaben, $n=31$), showing a stronger matrix effect than for procedures with a clean-up step included, i.e. QuEChERS and ethyl acetate.

The presence or absence of matrix effects was demonstrated by comparing the response produced from the analyte in an acetonitrile solution with that obtained from the same quantity of analyte in the presence of the matrix extract at the same levels of calibration. Values of both calibrations could be linearly fitted if both responses had no significant differences and, therefore, the intercept of this new fitting would be statistically equal to 0 (intercept intervals would include this value) and the slope would be statistically equal to 1 (slope intervals would include this value). The less precise calibration values were placed in the y-axis. Only the slopes and their intervals for the four methods are shown in Table 5 because of the high amount of data.

Cleaner extracts were obtained in QuEChERS method because of the less lipophilic co-extractives isolated by acetonitrile in comparison with acetone and ethyl acetate, to the addition of NaCl in the partitioning step that controlled the amount of extracted matrix components, and also, to the retention of fatty acids and other organic acids during the clean-up step with PSA. Ethyl acetate was more effective in avoiding sugar co-extractives but it also extracted more polar interferences from the matrix, mainly in comparison to acetone, however, the inclusion of the efficient GPC step provided cleaner extracts. Acetone partition with dichloromethane and light petroleum instead, was reported as more selective by decreasing the amount of polar co-extractives [2] but no difference in cleanliness was observed if compared with the acetone extraction without phase partitioning. The deviation of slopes from the unity was taken as a measure of the matrix effect. In this way, it can be seen that some compounds (terbutryn, $n=7$; pendimethalin, $n=8$) with slopes near to 1 for QuEChERS and ethyl acetate method, showed slope values very different from the unity for procedures without a clean-up step, i.e. mini Luke and acetone.

Co-eluting matrix interferences affected GC–TOF/MS analyses in two different ways. Some interferences did not allow proper deconvolution of peaks resulting in decreased responses. This is the case for metribuzin ($n=5$), terbutryn ($n=7$) and pendimethalin ($n=8$) in mini Luke and acetone extractions. However, including a clean-up step in the extraction method was shown to be effective enough and only bromoxynil octanoate ($n=11$) and ioxynil octanoate ($n=15$) were wrongly deconvoluted in QuEChERS extraction. For the rest of herbicides matrix enhanced their responses, being especially important for bromoxynil octanoate ($n=11$) for all extraction methods except for QuEChERS. Anyway, both nitrile herbicides, were not easily analysed by GC–TOF/MS because their target ion (127 m/z) was not specific as it was present in many matrix interferences; heavier ions were not abundant enough for quantifying, and in addition, these herbicides were retained in the sintered glass liner of the PTV injector.

One disadvantage in LC–MS/MS when using ES sources and working with raw extract of complex matrices, is the effect that the presence of matrix produced on analyte ionisation, signal inhibition but, in other cases, signal enhancement, rendering to an inaccurate quantitation. Most of the compounds experimented an enhancement in all extraction methods (including or not a clean-up step) suggesting that ES ionisation is affected by the presence of matrix interferences regardless to its amount. In addition, deviation of slopes from the unity was observed for all extracts and for most of the analytes ionized in positive mode when comparing to GC analysis. It must be taken into account that only ethyl acetate extracts were cleaned before the LC–MS/MS analysis being PSA clean-up avoided in QuEChERS procedure because it retained acidic herbicides [9].

It could be thought that clean-up steps could be skipped when extracts were analysed by LC–MS/MS because no advantage in avoiding signal enhancement was observed, but the clear benefits shown in GC–TOF/MS analyses and the need of less equipment maintenance, lead us to recommend their inclusion

Table 6
Recoveries and relative standard deviations (%) at 250 µg/kg spiking level barley samples extracted with the four evaluated procedures

No.	Compound	QuEChERS	RSD (n=6)	EtAc	RSD (n=3)	mini-Luke	RSD (n=3)	Ac	RSD (n=3)
1	Trifluralin	74.8b	1.5	31.3c	10.9	89.6a	2.6	79.0b	3.8
2	Triallate	73.4bc	1.7	68.2c	9.1	96.6a	1.4	79.9b	2.5
3	Terbuthylazine	73.1c	1.5	83.5b	9.1	100.0a	1.4	77.2bc	3.4
4	MCPA tioethyl	62.0c	5.7	58.9c	5.8	100.4a	1.3	75.7b	4.3
5	Metribuzin	83.5a	1.9	75.2a	3.5	57.8b	20.7	88.0a	2.8
6	Prosulfocarb	74.8b	1.7	78.5b	8.3	101.1a	3.4	81.1b	4.0
7	Terbutryn	76.9a	1.6	85.1a	8.0	85.9a	1.7	82.2a	10.8
8	Pendimethalin	76.0b	2.5	73.8b	8.2	111.2a	18.0	104.9a	0.9
9	Flamprop isopropyl	78.9bc	1.1	72.6c	6.5	97.6a	2.8	81.3b	3.7
10	Diclofop methyl	76.3c	2.1	75.6c	8.6	115.5a	0.7	93.2b	5.6
11	Bromoxynil octanoate	38.1c	9.3	79.5b	9.0	118.7a	9.2	77.3b	2.8
12	Carfentrazone ethyl	76.8c	2.9			113.3a	3.1	99.3b	3.2
13	Diflufenican	78.0c	2.1	74.1c	7.4	109.0a	3.3	87.6b	3.8
14	Mefenpyr diethyl	76.4c	1.2	67.0c	4.4	117.4a	7.0	89.9b	8.6
15	Ioxynil octanoate			72.9c	9.6	180.7a	5.5	103.3b	5.7
16	Fenoxaprop ethyl	80.3c	2.1	60.6d	9.8	107.7b	5.0	117.8a	1.6
17	Difenzoquat methyl sulphate	45.7b	16.2	1.4c	3.8	62.6a	3.4	38.2b	4.2
18	Clopyralid					50.9	19.7		
19	Florasulam	135.0a	2.5	0.6c	2.1	140.9a	5.8	102.0b	1.5
20	Metoxuron	68.8b	5.5	68.0b	5.4	82.3a	3.1	71.7b	3.4
21	Cyanazine	108.6b	1.1	77.2d	5.4	118.8a	4.5	85.1c	1.1
22	Triasulfuron	83.0b	3.9	78.7bc	4.0	96.3a	2.7	71.8c	2.2
23	Thifensulfuron methyl	89.3a	1.6	71.4b	4.6	93.4a	3.0	57.9c	4.4
24	Imazamethabenz methyl	77.8b	2.2	74.5b	4.6	89.6a	1.8	74.1b	3.0
25	Chlorsulfuron	92.4b	1.0	84.8c	4.6	99.4a	3.6	61.3d	5.5
26	Amidosulfuron	83.9b	1.2	75.7c	4.6	97.0a	6.1	67.5d	3.7
27	Tribenuron methyl	41.2d	4.5	71.2c	3.9	100.8a	3.2	82.4b	2.1
28	Chlortoluron	77.2c	3.2	68.4b	4.2	84.9a	2.2	76.5c	3.7
29	Methabenzthiazuron	100.5b	0.8	90.8c	4.0	112.6a	4.6	85.0c	1.5
30	Isoproturon	49.9c	13.7	68.2b	4.1	75.0ab	2.1	82.6a	5.8
31	Isoxaben	37.4c	19.5	60.4b	5.9	65.8b	4.1	87.4a	7.1
32	Linuron	71.4b	3.9	74.7b	3.5	88.7a	0.2	83.9a	3.7
33	Fenchlorazol ethyl	48.0c	4.4	56.7b	6.9	75.3a	1.2	79.3a	2.8
34	Bifenox	101.6b	2.6	86.5c	6.5	120.4a	3.2	96.1b	2.8
35	Tralkoxydim	93.1c	6.1	95.5c	0.8	121.8a	1.6	104.8b	3.3
36	Pyridate			62.3c	9.9	84.4b	2.1	120.4a	5.4
37	Fluroxypyr	65.6a	3.3	66.5a	3.7	39.0b	10.1	26.7c	6.1
38	Bentazone	70.7ab	5.9	75.4a	3.9	60.4b	10.7	69.3ab	4.6
39	Dicamba	60.7a	1.7	13.1c	40.3	27.2b	17.0	15.7c	13.1
40	MCPA	69.3b	3.3	79.4a	4.9	65.2b	5.3	41.0c	8.0
41	2,4-D	60.2a	1.7	40.3b	28.5	41.5b	6.0	30.5b	5.9
42	MCPP	63.2b	4.4	77.0a	5.6	77.1a	4.8	55.6b	9.8
43	Dichlorprop p	67.5ab	2.1	74.2a	5.8	62.9b	5.9	45.8c	5.7

Means followed by different letters in the same row are significantly different at $p < 0.05$ level according to Tukey's HSD test for unequal number of replicates.

in every extraction method, provided that good recoveries are achieved.

Matrix effect was found for most of the herbicides extracted by all procedures, including or not a clean-up step and, therefore, all analytes were quantified with matrix-matched standard calibration in order to avoid wrong results, which is in agreement with the recommendations in [21].

3.3.2. Recoveries

The four extraction methods were compared by extracting blank barley samples fortified at a 250 µg/kg level with the 43 herbicides of study. 6 repetitions of QuEChERS method were carried out; meanwhile the three other methods were only developed by triplicate. Matrix-matched calibrations were

used for quantification purposes in all methods, as already stated.

Results have been listed together in Table 6 for non-polar compounds, analysed by GC, and for more polar compounds, analysed by LC. The significance of differences was examined by applying analysis of variance (ANOVA) using the Statistica v 7.0 program package. Values represent means for the replicates for all the procedures, each obtained from spiked blank barley samples. Means followed by different letters in the same row are significantly different at $p < 0.05$ level according to Tukey's HSD test for unequal number of replicates.

All studied procedures were found to properly recover most of non-polar herbicides (70–110%, [21]), being always more

problematic the extraction of polar compounds with organic solvents in a unique multi-residue step.

Recovery efficiency for non-polar compounds extracted by the four studied procedures, and analysed by GC–TOF/MS (from compounds 1 to 16 in Table 6), was as follows: mini Luke > acetone > QuEChERS > ethyl acetate. The mini Luke extraction method was significantly more efficient for most of non-polar compounds. Average recoveries of mini Luke were near 100% except for metribuzin ($n=5$) which was not well deconvoluted due to matrix interferences only encountered with this extraction procedure. Less efficiency was accomplished by the unique acetone extraction because no non-polar solvents were used. QuEChERS method achieved an overall recovery value of 70%, significantly slightly lower than acetone extraction for some non-polar compounds. Nitrile herbicides were less extracted in the case of bromoxynil octanoate ($n=11$) or completely lost as ioxynil octanoate ($n=15$) with QuEChERS in comparison to the other three methods because they could not be well deconvoluted due to matrix interferences. Ethyl acetate was significantly the less efficient with slightly lower values than QuEChERS, especially for trifluralin ($n=1$) and carfentrazone ethyl ($n=12$) due to the high vapour pressure of both herbicides and the fact that extracts were concentrated till near dryness twice. In fact, it is thought that ethyl acetate properly extracted all residues but some herbicides were lost in the GPC clean-up and concentration steps. All methods were found to be precise ($RSD < 15\%$, [21]), for all the compounds analysed by GC–TOF/MS, except for metribuzin ($n=5$) and pendimethalin ($n=8$) in the mini Luke extraction due to matrix interferences. It can be concluded that the extraction of non-polar compounds was enhanced when no clean-up step was applied and when non-polar solvents were used.

Acidic herbicide recovery efficiency for the four studied methods analysed by LC–ESI (–)-MS/MS (from compound 37 to 43 in Table 6) was almost contrary to the non-polar recovery trend: QuEChERS = ethyl acetate > mini Luke > acetone. All studied procedures could not adequately recover most of polar herbicides, yielding recoveries below 70%. The best recoveries were achieved by QuEChERS and ethyl acetate methods. The addition of a proper combination of salts in QuEChERS was shown effective in providing a well-defined phase separation without dilution. Good recoveries (near to 70%) for polar compounds were achieved, as previously reported [9], and with better precision when comparing to ethyl acetate method for some compounds, i.e. dicamba ($n=39$) and 2,4-D ($n=41$). Both QuEChERS and ethyl acetate procedures were significantly more powerful than the acetone partition method (mini Luke) for the extraction of more polar compounds, as expected [14], because they remained in the aqueous phase. Acetone partition instead, significantly extracted more residues than acetone itself due to phase partitioning, showing that a unique organic solvent step was not able to adequately extract this type of compounds.

Recovery efficiency trend for medium-polar compounds, analysed by LC–ESI (+)-MS/MS (from compound 17 to 36 in Table 6), was not so obvious as it was for the compounds discussed before. It can be easily seen that mini Luke resulted in

higher recoveries than the other three methods and, in addition, it was the only method that extracted clopyralid ($n=18$), suggesting that phase partitioning with non-polar solvents is better to effectively extract medium-polar analytes than phase partitioning promoted by salts or a unique organic solvent step. Some herbicides (difenzoquat methyl sulphate, $n=17$; florasulam, $n=19$) showed good recoveries with all methods except for ethyl acetate which led us to think that they could have been removed by the clean-up step. Pyridate ($n=36$) was lost in QuEChERS extracts due to matrix interferences as previously seen in the matrix interference evaluation. In general, medium-polar compound recoveries at this concentration level were higher than 60% although there were some exceptions in all methods, especially in QuEChERS with values around 45% for difenzoquat methyl sulphate ($n=17$), tribenuron methyl ($n=27$), isoproturon ($n=30$), isoxaben ($n=31$) and fenclorazol ethyl ($n=33$).

4. Conclusions

Matrix effect due to matrix interferences was found for most of the herbicides extracted by all procedures, including or not a clean-up step and, therefore, all analytes needed to be quantified with matrix-matched standards. QuEChERS extracts were not as clean as GPC ones but they did not differ so much considering that QuEChERS clean-up step is much easier and less time-consuming. Anyway, results found, with such a little extraction time and organic solvent volume, were very promising compared to more complicated extraction procedures.

The extraction of non-polar compounds was enhanced when no clean-up step was applied and when non-polar solvents were used. Polar compounds needed a salt-promoted phase partition for being adequately extracted. The best recoveries for polar compounds were achieved by QuEChERS and ethyl acetate methods. Mini Luke was significantly more effective for the extraction of non-polar and medium-polar compounds suggesting that phase partitioning with non-polar solvents is more adequate than phase partitioning promoted by salts or a unique organic solvent step but it could not properly extract polar compounds. QuEChERS instead, was the only method that achieved an overall recovery value of 60–70% for non-, medium- and polar compounds, with some exceptions due to co-eluted matrix interferences. As a conclusion, it resulted to be the most universal extraction method by providing a well-defined phase separation without dilution and achieving acceptable recoveries in average including the extraction of the always difficult acidic herbicides. However, recoveries were not as good as required for validation purposes suggesting that residues are prone to strong matrix interactions in dry samples as barley and further studies incrementing solvent strength, extraction time or more acidic or basic conditions are needed in order to achieve a complete extraction.

Acknowledgment

The authors wish to thank the Agrarian Technological Institute of “Castilla y León” for financial support.

References

- [1] J. Tekel, J. Kovacicová, J. Chromatogr. 643 (1993) 291.
- [2] M.A. Luke, J.E. Forberg, H.T. Masumoto, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58 (1975) 1020.
- [3] H.J. Stan, M. Linkerhägner, J. Chromatogr. A 750 (1996) 369.
- [4] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, J. AOAC Int. 78 (1995) 1252.
- [5] European Commission's Proficiency Tests on Pesticide Residues in Fruit and Vegetables 1996/1997, Final Report August 1997, National Food Administration, Uppsala, 1997.
- [6] Method IA-Multi-residue, National Program of Residues, M.A.P.A. (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), Spain, 1996.
- [7] J. Klein, L. Alder, J. AOAC Int. 86 (2003) 1015.
- [8] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, J. Chromatogr. A 882 (2000) 175.
- [9] K. Mastovska, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 259.
- [10] S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 83 (2000) 680.
- [11] P.A. Mills, J.J. Onley, R.A. Gaither, J. Assoc. Off. Agric. Chem. 46 (1963) 186.
- [12] J. Sherma, J. AOAC Int. 84 (2001) 1303.
- [13] F. Schenck, P. Callery, P. Gannett, J. Daft, S. Lehotay, J. AOAC Int. 85 (2002) 1177.
- [14] W. Krijgsman, C.G. van de Kamp, J. Chromatogr. 117 (1976) 201.
- [15] A.H. Roos, A.J. van Munsteren, F.M. Nab, L.G.M. Th Tuinstra, Fresenius Z. Anal. Chem. 322 (1985) 443.
- [16] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC Int. 86 (2003) 412.
- [17] S.J. Lehotay, A. Lightfield, J. Harman-Fetcho, D. Donoghue, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4589.
- [18] M. Godula, J. Hajslova, K. Mastovska, J. Krivankova, J. Sep. Sci. 24 (2001) 355.
- [19] Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, Part I, General Inspectorate for Health Protection, Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, 6th ed., 1996.
- [20] D.R. Erney, T.M. Pawlowski, J. High Resolut. Chromatogr. 20 (1997) 375.
- [21] Document No. SANCO/10232/2006. European Commission, Brussels, 2006.

Orthogonal array optimization of a multiresidue method for cereal herbicides in soils

C. Díez^{a,*}, E. Barrado^b, P. Marinero^a, M. Sanz^a

^a Agrarian Technological Institute of “Castilla y León”, Ctra. Burgos, km. 119, 47071 Valladolid, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Valladolid,
Prado de la Magdalena s/n, 47005 Valladolid, Spain

Received 30 October 2007; received in revised form 1 December 2007; accepted 5 December 2007

Available online 23 December 2007

Abstract

Nearly 40 herbicides, commonly used for barley, were selected for analysis in soils of this crop. The primary objective was to develop a multiresidue method taking into account that herbicides belonged to different chemical families. Some preliminary experiments with different solvents in combination with water, acetic acid and ammonium hydroxide, were developed in order to design the predefined region covered by the orthogonal array design used for optimization. Final extracts were splitted in two aliquots, one of them was directly analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), and the other one was derivatized before the acidic analyte analysis. Principal component analysis (PCA) was applied to the data generated in the preliminary experiments, in order to clarify the relationships among the different variables studied. According to the obtained results, the following variables were selected: solvent type and ratio, amount of acetic acid and extraction time. The statistical analysis revealed that all the factors were significant being the most important, the type and ratio of solvent for basic and neutral herbicides and the acetic acid percentage for acid herbicides. The final optimized method consisted of shaking previously wet soil samples for 30 min with 30 ml of acetone acidified with 1% acetic acid. Method validation was evaluated following the EU guidelines.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Soil; Herbicide; Residue; Extraction; Principal component analysis; Orthogonal array design; Validation

1. Introduction

The two cereal crops which are grown most abundantly in the EU are wheat and barley [1]. Herbicides play a very important role in effectively controlling annual grasses and broad-leaved weeds affecting these crops. Their use cannot be neglected due to the enormous benefits in agricultural outputs. However, due to their widespread and possible toxicity in the environment, it is important to monitor their residues. Under realistic field situations there is a potential exposure to agricultural soils by these products indirectly through spray drift and run-off from crop vegetation surfaces, and directly through soil treatment practices [2]. The determination of acidic herbicides in soils is of concern because they have harmful effects on the microflora of the soil when they are not degraded quickly enough [3]. There

are many compounds registered as herbicides intended for their use in cereal crops, which can be classified into several chemical classes in accordance with their chemical structures [4].

Acidic herbicides (dicamba, $n = 1$; ioxynil, $n = 12$), are widely used for control of broad-leaved weeds and other vegetation because they are relatively inexpensive and very potent even at low concentrations [5]. Phenoxy acids can be applied in the form of free acids, salts or esters [6]. Herbicides formulated as esters have been reported to rapidly hydrolyze in contact with soil to their corresponding acids and phenols [7], which involves that both forms need to be monitored. Substituted ureas are also one of the oldest herbicide groups used in agriculture, being two of the most important, phenylureas, employed since early fifties, and sulphonylureas, developed more recently with a high herbicidal activity resulting in low application doses [8]. Among the basic herbicides (cyanazine, $n = 13$; carfentrazone ethyl, $n = 17$), triazines are among the most important selective herbicides [9]. Triazinic herbicides have been widely used in the last years for crop protection in agriculture and weed removal in different

* Corresponding author. Tel.: +34 983423595.
E-mail address: diegarci@jcy.es (C. Díez).

lands. Among neutral herbicides, dinitroaniline herbicides are usually soil applied in a wide variety of agronomic crops and particularly, in winter and spring cereals. Thiocarbamates have been used as herbicides in maize and wheat for several decades [8].

Since spray history or environmental background of most samples is unknown, method development efforts have concentrated on multiresidue methods [10,11]. They require universality of the isolation and clean-up procedure and, as far as possible, unification of the conditions of the chromatographic separation [12]. There are some multiresidue methods for herbicide residues in soils, which use acetone, acetonitrile and ethyl acetate, sometimes at acidic pH, as the most usual organic solvents [13,14], but most of them only cover herbicides belonging to the same family.

The use of GC–MS is, at present, the most versatile and sensitive method for residue analysis due to the high sensitivity obtained and MS is the most valuable detection technique because it provides information on the compound molecular structure and it is also highly sensitive and selective when used in the single ion monitoring (SIM) mode [8].

Optimization can be achieved either by the trial and error method, the one factor at a time method or by systematic methods. In recent years, fractional factorial designs, such as orthogonal array designs have been used very efficiently to know the way different parameters affect the recovery and the interactions among them [15]. Previous knowledge of the variables, past experience and intuition is very helpful in arranging the variables and levels of the experiment because orthogonal array designs only cover a predefined region [15]. This type of optimization procedures implies the use of a strategically designed experiment which deliberately introduces changes in order to identify factors affecting the procedure, and estimate the factor levels yielding an optimum response.

The primary objective of this work was to develop a multiresidue method taking into account that herbicides belonged to very different chemical families by studying the influence in recovery of some variables in a set of previous experiments analyzed by PCA. Then, the most important factors affecting herbicide extraction were optimized by an orthogonal array design. Finally, the optimized procedure was validated according to EU guidelines [16].

2. Experimental

2.1. Chemicals

All herbicide standards were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Organic solvents intended for extraction, were at least HPLC grade and were provided by Labscan (Dublin, Ireland) together with the glacial acetic acid and the ammonium hydroxide (28% in water). Trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) purum 0.25 M in methanol, was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and stored at 4 °C. Bulk quantities of Na₂SO₄, obtained from Merck (Darmstadt, Germany), were heated to 500 °C for more than 5 h to remove phthalates and any residual water prior to its use in the laboratory.

2.2. Standards

The herbicides studied in this work are summarised in Table 1 together with some important physicochemical properties [17]. Individual stock standard solutions (1000 mg/l) were prepared in acetone and stored in the dark at –20 °C. They were kept for 1 h at ambient temperature previously to their use. Working standard mixtures in acetone, containing 10 mg/l of each pesticide were prepared by dilution.

Calibration standards were prepared by dilution in acetone acidified with 1% acetic acid. The internal standard was prepared by dissolving Alachlor (a sunflower herbicide) in acetone to make stock solutions of 1000 mg/l and diluted in acetone acidified with 1% acetic acid to 1 mg/l before addition to samples.

2.3. Soil samples

The same soil was used for all the tests: 46% sand, 37% silt, 17% clay; 0.69% organic matter, 8.5 pH (H₂O) and 9.2 meq/100 g ion-exchange capacity.

Soil samples were allowed to dry at room temperature in the dark, sieved and frozen at –20 °C till extraction. Fortified samples were prepared by spiking blank soil samples, previously unfrozen at ambient temperature, with different known volumes of working standard solution. They were homogenized by mechanical shaking for 30 min for better analyte distribution and the bulk of the solvent was left to evaporate at ambient temperature and controlled by weight. This is a procedure able to mimic weathered residues [18,19].

2.4. Procedures

Both acidic and ester forms of some herbicides are going to be monitored together. Due to dual methyl ester formation from the acid and ester forms when derivatizing these analytes prior to their analysis [20], all the experiments were developed separately for the acidic herbicides and for the basic and neutral herbicides in order to know which form the methyl ester came from.

All samples were quantified with matrix-matched standard calibrations prepared with blank soils extracted in the same way as samples in each trial.

2.4.1. Previous tests

Table 2 shows the previous tests designed to characterize the influence of the variables that will be further optimized with the orthogonal array design. These experiments were designed taking into account the Kovacs series of extraction solvents [21], together with the use of different modifiers found in the references. The addition of water has been reported, in some cases, to increase desorption of herbicides from the matrix because it is both a solvent for the analyte and a solute that can compete for adsorption sites [22]. The neutral (dinitroanilines, phenylureas, thiocarbamates) and basic (triazines) multiresidue herbicide extractions from soils are usually carried out with organic solvents [22]. Acetone was chosen as the unique organic solvent in these previous experiments because it has been widely used

Table 1
Chemical characteristics of the herbicides of study: structural group, molecular formula (MF), molecular weight (MW), log of octanol–water coefficient (log K_w), and acid dissociation constant (pK_a)

Number	Compound	Structural group	MF	MW	log K_w	pK_a (25 °C)
1	Dicamba	Benzoic acid	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221.0	0.55	1.87
2	2,4-D	Aryloxyalkanoic acid	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	225.7	−0.83	2.87
3	MCP ^a	Aryloxyalkanoic acid	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214.6	0.64	3.11
4	Dichlorprop p	Aryloxyalkanoic acid	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	235.1	−0.56	3.67
5	MCP ^b	Aryloxyalkanoic acid	C ₉ H ₉ ClO ₃	200.6	2.80	3.73
6	Amidosulfuron	Sulfonylurea	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₇ S ₂	369.4	1.63	3.58
7	Tribenuron methyl	Sulfonylurea	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₆ S	395.4	0.78	4.70
8	Fenoxaprop p	Aryloxyphenoxypropionic acid	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	333.8	1.83	4.60
9	Diclofop	Aryloxyphenoxypropionic acid	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	326.2		3.60
10	Flamprop	Aryaminopropionic acid	C ₁₆ H ₁₃ ClFNO ₃	221.0	2.90	3.70
11	Bromoxynil	Hydroxybenzotrile	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	276.9	1.04	3.86
12	Ioxynil	Hydroxybenzotrile	C ₇ H ₃ I ₂ NO	370.9	2.20	4.10
13	Cyanazine	Chlorotriazine	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	240.7	2.10	0.63
14	Terbutylazine	Chlorotriazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229.7	3.21	2.00
15	Terbutryn	Methylthiotriazine	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241.4	3.65	4.30
16	Metribuzin	Triazinone	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	214.3	1.65	
17	Carfentrazone ethyl	Trialinone	C ₁₃ H ₁₀ Cl ₂ F ₃ N ₃	412.2	3.36	
18	Metoxuron	Phenylurea	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	228.7	1.60	
19	Isoproturon	Phenylurea	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206.3	2.50	
20	Chlortoluron	Phenylurea	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	212.7	2.50	
21	Methabenzthiazuron	Urea	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	221.3	2.64	
22	Linuron	Phenylurea	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249.1	3.00	
23	Tralkoxydim	Cyclohexadione oxime	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	329.4	2.10	
24	Flamprop isopropyl	Aryaminopropionate	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363.8	3.69	
25	Mefenpyr diethyl	Herbicide safener	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₄	373.2	3.83	
26	MCPA tioethyl	Phenoxyacid	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂ S	244.7	4.05	
27	Bifenox	Diphenyl ether	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO ₅	342.1	4.48	
28	Fenoxaprop p ethyl	Aryloxyphenoxypropionate	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	361.8	4.58	
29	Diclofop methyl	Aryloxyphenoxypropionate	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	341.2	4.60	
30	Prosulfocarb	Thiocarbamate	C ₁₄ H ₂₁ NOS	251.4	4.65	
31	Triallate	Thiocarbamate	C ₁₀ H ₁₆ Cl ₃ NOS	304.7	4.66	
32	Diffufenican	Carboxamide	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	394.3	4.90	
33	Pendimethalin	Dinitroaniline	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281.3	5.18	
34	Trifluralin	Dinitroaniline	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335.3	5.27	
35	MCP ^a isocytic	Phenoxypropionate	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₃	327.6		
36	Bromoxynil octanoate	Hydroxybenzotrile	C ₁₅ H ₁₇ Br ₂ NO ₂	403.0	5.40	
37	Ioxynil octanoate	Hydroxybenzotrile	C ₁₅ H ₁₇ I ₂ NO ₃	497.1	6.12	

^a Mecoprop or 2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propanoic acid.

^b (4-Chloro-2-methylphenoxy)acetic acid.

in herbicide extraction [13], and due to its medium polarity and water miscibility it can provide a general overview. Acidic herbicides (phenoxyacids, benzoic acids, sulfonylureas) are usually extracted from soils with solid–liquid extraction with organic solvent–water mixtures at an acid pH with a solvent of medium polarity or with an alkaline solution. Afterwards, the extract is acidified and partitioned into an organic solvent immiscible with water or concentrated with solid-phase extraction (SPE) [19,23,24]. The use of some modifiers was tested in order to increase recoveries of ionic herbicides. Many procedures have been shown to effectively extract acid herbicides with organic solvents of medium polarity in mixtures with water and acetic acid [23,25–28]. In the same way, ammonium hydroxide has been reported to enhance basic herbicide recoveries [26]. The percentages of modifiers used in each experiment were adjusted according to the final pH obtained in the mixture with soil.

Quantities were made equivalent in order to compare for recoveries. The same sample:solvent ratio was used in all these

previous tests (1:3.2). A representative soil sample of 15 g [29], spiked at 0.05 mg/l, was placed in a 100 ml brown glass tube, and was mechanically shaken for 1 h with the different solvent combinations summarised in Table 2. After centrifugation at 2500 rpm for 5 min, an extract volume equivalent to 8 g of soil was recovered and concentrated until near dryness in a turbo vap at 35 °C. 50 µl of 20% of ethylene glycol in acetone, used as a holder solution, was added to the extract before evaporation [6]. Then, the concentrated extract was filled up with acetone:1% acetic acid until an equivalent concentration of 8 g/ml, filtered through a 0.45 µm PTFE filter and added the internal standard previously to the GC–MS analysis.

A fixed water volume of 7.5 ml, enough to adequately wet 15 g of the spiked soil, was added in all the tests where water addition was tested. They were mixed and kept 1 h for adequately swelling at room temperature previously to the addition of the corresponding solvent tested. After shaking the mixture for 1 h, and centrifugation at 2500 rpm for 5 min, the supernatant was

Table 2
Recoveries (%) and relative standard deviations (RSD) at 50 µg kg⁻¹ spiking level soil samples extracted with the different procedures tested and spiked with acids and basics and neutrals (Bs and N)

Soil (g)	Previous tests	Modifier (%)	Solvent (ml)	Water (ml)	Ratio	Solvent pH	(Soil + solvent) pH	Total (%)	%RSD (n=5)	Acids (%)	%RSD (n=5)	%Bs and %N	%RSD (n=5)
15	Ac		47.50			7.20	7.23	97.55a	0.49	95.09a	0.90	98.72a	0.64
	NaOH 0.5N LLP pH 2		47.50	47.50		13.02	11.70	81.12d	0.86	49.62c	3.69	96.24ab	1.41
	Ac:H ₂ O LLP		40.0	7.50		7.20	7.23	86.55c	1.16	97.34a	1.88	81.37d	0.90
	Ac:H ₂ O LLP pH 2		40.0	7.50		7.20	7.23	87.37c	2.51	60.81b	4.65	100.12a	1.90
	Ac:HAc	1.0	47.5		1:3.2	4.14	5.20	92.70b	0.77	92.42a	0.86	92.84b	0.75
	Ac:H ₂ O:HAc LLP	1.0	40.0	7.50		4.14	5.20	89.72bc	0.61	97.08a	0.57	86.19c	1.21
	Ac:H ₂ O:HAc LLP pH 2	1.0	40.0	7.50		4.14	5.20	69.77e	0.60	20.79d	8.33	93.29b	1.04
	Ac:NH ₃	0.1	47.5			9.50	9.10	78.58d	1.09	47.19c	2.13	93.64b	0.85
	Ac:H ₂ O:NH ₃ LLP	0.1	40.0	7.50		9.50	9.10						

Means followed by different letters (a–e) in the same column are significantly different at $p < 0.01$ level according to Tukey honest test for equal number of replicates. Acetone (Ac) and acetic acid (HAc).

Table 3
Factors and levels for the optimization experiment

Notation	Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A	Solvent + water	Acetone	Ethyl acetate	Acetonitrile
B	Acetic acid (%)	0.5	1	2
C	Volume (ml)	15 (1:1.5)	30 (1:2.5)	45 (1:3.5)
D	Shaking time (seg.)	15	30	60

partitioned with 30 ml of dichloromethane. Enough Na₂SO₄ to bind the water was added. After filtration through a glass funnel filled with quartz wool and more Na₂SO₄, an extract volume equivalent to 8 g of soil was recovered and the procedure was developed in the same way as the previous ones.

No pH adjustment for non-ionic and basic analyte water removal by liquid partition has been reported [30], meanwhile methods without previous acidification [25] and with previous pH adjustment to pH 2 [13,24,31] have been found for acid analytes. Both procedures were developed in order to study whether polar pesticides were lost in the aqueous phase with the different solvent combinations tested.

Acetone was used as selective for neutral and basic herbicides [13], as a unique extraction step with no dilution with water immiscible solvents, in case they could lead to some herbicide losses. Alkaline extraction with sodium hydroxide 0.5 M was used as selective for acid herbicides [32].

2.4.2. Orthogonal array design

Table 3 shows the different variable values taken for the multiresidue extraction optimization design. Although the optimization by factorial designs is regarded as a simultaneous method, the optimum is actually located step by step as in sequential approaches. Therefore, after carefully studying the results obtained from the previous experiments, the following variables were selected: solvent type and ratio, pH (percentage of acetic acid) and shaking time.

Three levels for each control factor instead of two were chosen to detect any quadratic or non-linear relation between the factors and the output variable, and to obtain information over wider ranges of the variables. Four control factors at three levels contain eight degrees of freedom, and can be fitted to the L₉(3⁴) orthogonal array which provides the greatest amount of information from the minimum number of experiments and allows to separate the effect of each factor on the output variable in terms of mean response (regular analysis). The nine different trials resulting from this design were duplicated in order to calculate the residual error. The order in which the experiments were developed was previously randomized. The design matrix that indicates the combination of control factor levels to be tested is shown in Table 4.

A 15 g amount of spiked soil at 0.05 mg/l was placed in a 100 ml brown glass tube, added 7.5 ml of water, mixed and kept 1 h for adequately swelling at room temperature previously to the addition of the solvent. After shaking the mixture for the appropriate time, and centrifugation at 2500 rpm for 5 min, the supernatant was partitioned with 30 ml of dichloromethane. Enough Na₂SO₄ to bind the water was added. Then, the extract

Table 4
Experimental $L_9(3^4)$ orthogonal array

Trial	Control factors and levels				Acids	Basics and neutrals
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	80.13	100.54
					77.64	100.84
2	1	2	2	2	93.34	93.65
					92.12	94.40
3	1	3	3	3	94.18	83.12
					94.30	83.34
4	2	1	2	3	69.67	76.73
					69.51	76.59
5	2	2	3	1	74.86	67.68
					74.35	68.83
6	2	3	1	2	81.77	78.15
					82.54	79.28
7	3	1	3	2	79.73	84.77
					80.23	85.91
8	3	2	1	3	88.13	93.67
					88.21	93.84
9	3	3	2	1	93.83	86.46
					92.97	87.08

The acids, and basics and neutrals average recoveries have been determined for each trial and for both acid, and basic and neutral herbicides matrix.

was filtered through a glass funnel filled with quartz wool and more Na_2SO_4 , and an extract volume equivalent to 8 g of soil was recovered and taken to near dryness as already stated.

2.5. Equipment

An Agilent Technologies 6890N Network GC System chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with an Agilent Technologies 7683 Series splitless injector and an Agilent Technologies 5973 quadrupole mass-selective detector operated in the SIM mode was used. A J&W Scientific, DB-17 (30 m \times 0.25 mm I.D.), 0.25 μm film thickness column, was employed with helium (99.999% purity) as carrier gas at a constant flow of 1 ml/min. Injector temperature was set at 250 °C and the transfer line temperature at 280 °C. Splitless injection volume was 1 μl .

The oven temperature for acids analysed as their methyl esters/ethers was maintained at 60 °C for 1 min and then programmed at 22 °C/min to 290 °C, held for 4.55 min. The oven temperature for neutral and basic analytes, was maintained at 60 °C for 1 min and then programmed at 6 °C/min to 165 °C, then at 12 °C/min to 215 °C, then at 2 °C/min to 230 °C and finally at 8 °C/min to 280 °C, held for 10 min.

2.6. Analysis

In every experiment a fixed extract volume equivalent to 8 g of soil was evaporated to dryness, dissolved in 1 ml of acetone:1% acetic acid and split in two aliquots. One of them

was directly analyzed by GC–MS and the second one was derivatized before the acidic analyte analysis with a previously optimized procedure [20], which consists of adding 100 μl of TMSH derivatization reagent to 500 μl of final extract directly in the vial. Redissolution in any organic solvent acidified with 1% acetic acid was important because it has been previously demonstrated that the presence of the anionic form of the acids was essential for methylation with TMSH. A final extract pH value of 3.2 was found in all the tests prior to analysis, increased till 6 after TMSH addition, ensuring a proper methylation of the analytes regardless to the solvent combination tested.

TMSH methylation of carboxylic acids provided methyl esters while phenols (nitrile herbicides: bromoxynil, $n = 11$ and ioxynil, $n = 12$) could be identified from the total ion current chromatogram after derivatization as their methyl ethers. The addition of TMSH promoted not only esterification of acids/phenols but also trans-esterification of some other different esters to their corresponding methyl ones. As a result, methyl esters/ethers were the final product of both reactions [20].

2.7. Quantitation

After the acquisition of the total ion chromatogram of a mixture of herbicide standards in acetone acidified with 1% acetic acid in the scan mode, peaks were identified by their mass spectra. The most abundant ion that showed no evidence of chromatographic interference, and the highest signal-to-noise ratio, was taken for quantification purposes. Other two ions not exclusively originated from the same part of the molecule, were selected for diagnosis. Analyses were carried out in SIM mode. Analytes were identified by comparing their retention times and ions with those from a standard calibration. The ratio of the chromatographic relative retention time of the analyte, shall correspond to that of the calibration standards at a tolerance of $\pm 0.5\%$ [33] (Table 5).

A very little volume (20 μl of a 1 mg/l solution), not to dilute the sample, of the internal standard, was added to the vial just before analysis to control the amount of analytes passing to the column. The analyte concentrations were deduced from their response relative to that produced by this internal standard provided that it was reliably detected without interferences. The addition of an internal standard to the final extract just prior to injection, served as a calibration for retention times and/or peak heights/areas and helped to improve the precision of quantitation but it was never used to correct for recoveries [34].

The concentration of the neutral and basic herbicides of study was determined by comparing peak areas in the sample with those found for mixtures of herbicide standards of known concentration analysed in the same conditions. Acidic herbicides were compared with procedural standards, i.e. mixtures of acid standards of known concentration derivatized in the same way as samples. Previous experiments were developed to demonstrate the quantitative acid/phenol and ester conversion to their methyl esters/ethers, even in the presence of matrix interferences [20].

The effect of the presence of substance/s in the matrix in the chromatographic determination, was corrected with the use

Table 5

Retention times, quantification ions, linearity coefficients (matrix-matched calibration), limits of detection (LOD), and limits of quantification (LOQ) for the studied herbicides

Number	Compound	Retention time (min)	Target ion	Linearity coefficient	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linear fit	
							b	$t \times Sb$
1	Dicamba	8.20	203	96.69	2.39	7.26	2.14	0.03
2	2,4-D	8.91	199	95.15	4.09	12.44	2.96	0.32
3	MCP	8.15	169	96.14	4.28	13.00	2.43	0.10
4	Dichlorprop p	8.60	162	95.72	0.99	3.02	2.77	0.12
5	MCPA	8.45	214	95.87	4.00	12.17	2.72	0.08
6	Amidosulfuron	9.75	154	95.06	7.79	23.69	1.70	0.13
7	Tribenuron methyl	10.14	154	96.20	9.07	27.56	1.22	0.12
8	Fenoxaprop p	14.32	347	95.99	4.73	14.38	5.38	0.50
9	Diclofop	12.58	340	96.52	4.19	12.75	2.01	0.09
10	Flamprop	11.65	105	95.05	2.71	8.25	2.48	0.10
11	Bromoxynil	9.05	291	95.11	2.81	8.55	3.20	0.22
12	Ioxynil	10.75	385	95.09	4.55	13.84	3.11	0.31
13	Cyanazine	15.87	240	95.94	3.34	10.15	0.78	0.05
14	Terbutylazine	13.46	173	96.38	4.21	12.79	1.21	0.04
15	Terbutryn	14.72	226	96.47	4.16	12.64	1.22	0.03
16	Metribuzin	14.84	198	95.70	6.43	19.53	1.29	0.05
17	Carfentrazone ethyl	18.50	312	96.63	5.34	16.23	1.27	0.01
18	Metoxuron	10.26	168	95.96	7.76	23.60	0.72	0.02
19	Isoproturon	7.67	161	96.41	3.86	11.73	0.77	0.03
20	Chlortoluron	8.08	167	95.76	3.55	10.80	0.72	0.02
21	Methabenzthiazuron	13.45	164	95.63	6.98	21.23	1.47	0.10
22	Linuron	15.00	248	97.68	4.45	13.54	2.56	0.33
23	Tralkoxydim	22.93	137	95.23	7.16	21.76	0.75	0.06
24	Flamprop isopropyl	17.68	105	97.05	5.67	17.22	1.25	0.06
25	Mefenpyr diethyl	20.05	299	96.39	5.97	18.14	1.38	0.03
26	MCPA tioethyl	13.77	244	96.51	5.07	15.41	1.35	0.05
27	Bifenox	21.55	341	96.01	6.08	18.49	1.59	0.05
28	Fenoxaprop p ethyl	23.12	288	95.77	6.10	18.55	1.55	0.03
29	Diclofop methyl	19.60	340	96.72	6.63	20.15	1.26	0.06
30	Prosulfocarb	14.42	251	96.60	5.15	15.66	1.24	0.05
31	Triallate	13.42	270	96.91	5.44	16.54	1.28	0.04
32	Diflufenican	18.98	394	96.50	6.69	20.35	1.42	0.09
33	Pendimethalin	15.35	252	95.05	5.10	15.50	1.40	0.02
34	Trifluralin	11.50	306	95.79	5.24	15.94	1.44	0.06
35	MCP isoctylic	15.32	169	96.47	6.15	18.68	1.29	0.07
36	Bromoxynil octanoate	18.40	127	96.19	5.75	17.48	1.33	0.06
37	Ioxynil octanoate	22.12	127	95.90	7.93	24.10	1.17	0.12

Acidic herbicides are shown as their methyl esters/ethers. Slopes (b) and intervals of the slopes ($t \times Sb$) of the linear fit of responses in matrix-matched standards vs. responses in acetone acidified with 1% acetic acid calibration.

of calibration lines prepared in 900 μl of blank soil extracts obtained in the same way as samples in each trial, i.e. matrix-matched standard calibration [6].

3. Results and discussion

3.1. Previous experiments

3.1.1. PCA

PCA was applied to the average herbicide recovery values of five replicates obtained in these previous experiments in order to provide a global overview and clarify the relationships among the several variables related to the extraction procedure and their effects on extractability, by reducing the dimensionality of the dataset to a smaller number of composite variables. Both average recoveries for basic and neutral herbicides with acetone extrac-

tion and for acidic herbicides with alkaline extraction were taken together as the specific method results.

Statistical analyses were performed using the Minitab v.13.0 program package, with the Ward linkage method, and using none rotation option. The eigenvalues of the correlation matrix are shown in Fig. 1. From the PCA it was found that 93.80% of the variation of the dataset could be explained using four factors. From the loading on the four factors of the PCA (Table 6) some conclusions can be drawn. The factor pattern of component 1 showed contributions from a set of procedures intended for neutral and basic herbicides while those more specific for acid herbicides formed the component 2. Components 3 and 4 consisted of both the specific methods and the acetone–water–acetic acid combination for all the herbicides of study.

The PCA showed groupings of the herbicides based on their chemical nature (Fig. 2). Acidics are grouped separately from the

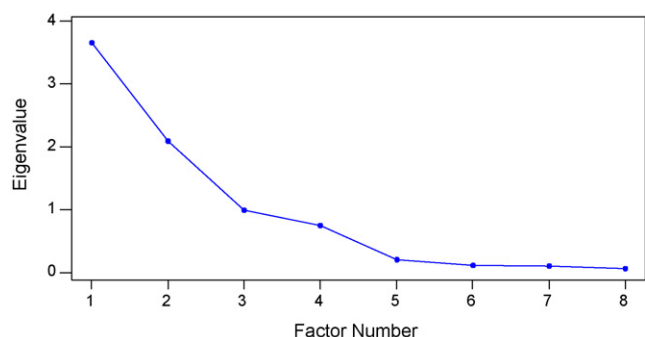


Fig. 1. Plot of eigenvalues of the PCA using data from the eight different previous tests.

Table 6

Loading of variables on the four first components resulting from the principal component analysis of extraction procedures with different solvent combinations with water and modifiers

Variables	Components			
	1	2	3	4
Specific		-37.89	-82.52	-35.91
Ac:H ₂ O LLP	-92.51			
Ac:H ₂ O LLP pH 2		-90.25		
Ac:HAc	-92.58			
Ac:H ₂ O:HAc LLP		-50.72	51.77	-64.08
Ac:H ₂ O:HAc LLP pH 2		-90.82		
Ac:NH ₃	-94.85			
Ac:H ₂ O:NH ₃ LLP	-88.78			
%Var	45.80	26.20	12.40	9.40

Component loading less than |0.35| are omitted. For details on variables see Table 4.

basics and neutrals, which did not show a different trend between them implying that both types of analytes could be extracted with the same procedures. However, acids are very different in nature and needed specific extraction methods. Loadings for both methods with pH adjustment before the partitioning step, lay near the acidic analytes (dotted lines) while loadings for acetone in combination with water and ammonium hydroxide (striped lines) are orientated to the basic and neutral grouping. Loadings for the

specific methods and the acetone–water–acetic acid combination (black lines) are directed in the same way, their direction of maximum dispersion laying between the acid and basic and neutral groupings, which could indicate the suitability of this combination of solvents and modifiers as multiresidue methods. This result was also found in the cluster analysis (Fig. 3), where procedures were grouped in similarity in this way: neutral and basic herbicides, liquid–liquid partitioning at pH 2 for acids, and specific methods and acetone–water–acetic acid for all of the studied herbicides.

3.1.2. Recoveries

pH measurements in solvent mixtures of organic solvents with water and modifiers were made directly because the glass electrode responded nearly ideally to pH in methanol, acetonitrile, water, and mixtures of these solvents [35]. The difference has been reported to be less than 0.1 pH unit for solutions of as much as 50% of organic solvent but became larger when there was no water in the mixture [35]. However, pH measurements in soil–organic solvent–modifier combinations were made after adding a proper volume of water in order to reach a 1:2.5 ratio (g of soil:ml of water) [24], regardless to the extraction solvent volume tested. Mixtures were shaken for 10 min in an orbital shaker, kept 30 min at room temperature and pH was directly measured in the supernatants with a glass electrode. The modifier percentage added to the solvent combination was calculated taking into account the final soil–solvent combination pH values (Table 2). Acetic acid percentage was as critical as ammonium hydroxide due to the quick degradation of some herbicides at extreme pH values (tribenuron methyl at pH values below 4 [32]). Therefore, 1% acetic acid, which provided a soil pH value of 5, and 0.1% ammonium hydroxide, which provided a soil pH value of 9 [26], were selected although other percentages could be used as well if the procedure was performed quickly.

Basic herbicides behaved in the same way as neutral analytes, therefore their recoveries were averaged together. The significance of differences among the procedure recoveries was examined by applying analysis of variance (ANOVA). Values represent means for the average recovery replicates for all the

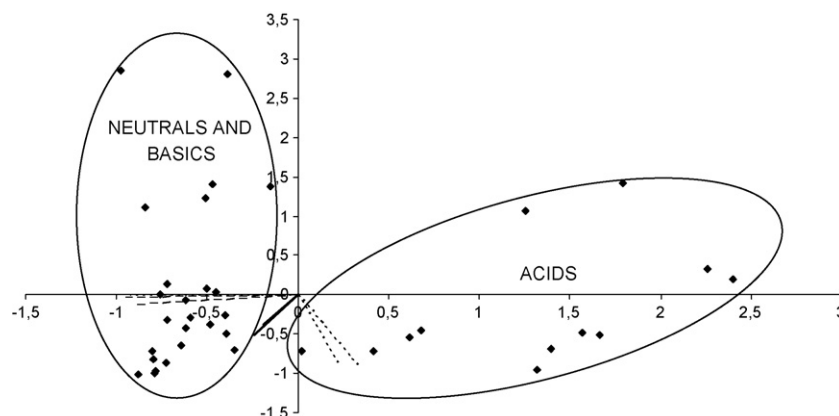


Fig. 2. Score plot for first two factors for all the herbicides. Loadings for the eight different methods tested have been represented as lines.

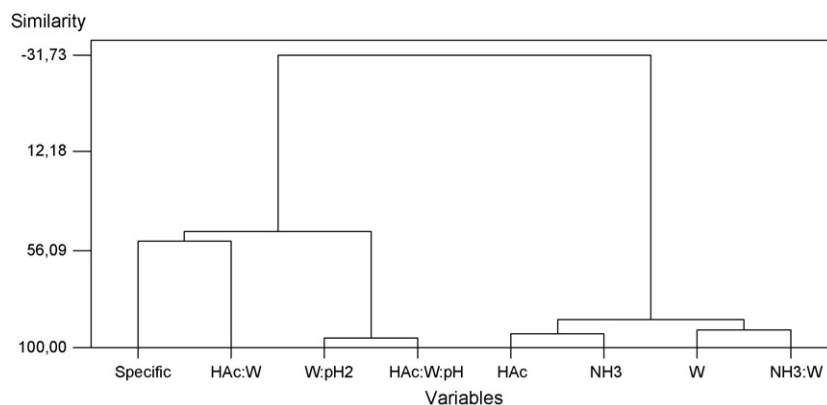


Fig. 3. Cluster variables for the eight methods studied. It groups similar variables.

spiked blank soil samples extracted with the different procedures tested (Table 2). Means followed by different letters in the same column are significantly different at $p < 0.01$ level according to Tukey honest test for equal number of replicates.

The acetone–water–acetic acid combination was significantly the more efficient in extracting the whole range of different herbicides apart from the specific methods. The best acidic average recoveries were found for those combinations using water–acetic acid and those using a partitioning step with prior pH adjustment to pH 2. However, these both last methods were exactly the less effective in extracting basic and neutral analytes, although they were significantly recovered by the rest of the tested extraction methods. Basic recovery showed no enhancement with the use of ammonium hydroxide as expected [26]. The addition of water alone did not significantly recover more residues than the organic solvent as previously reported [22]. However, the addition of acetic acid to the water and acetone combination enhanced significantly the acidic recovery with no detrimental in the basic and neutral extraction, and no pH adjustment prior to the dichloromethane partition was needed.

3.2. Orthogonal array design results

After carefully studying the results obtained from the previous experiments, the following variables were selected: solvent type and ratio, pH (percentage of acetic acid) and shaking time. Acetone [13], ethyl acetate [32,36] and acetonitrile [30] were selected as organic solvents because they are among the most used extractants in neutral and basic multiresidue herbicide procedures in soils. Ammonium hydroxide was not suitable for acids and showed no effect in basic recoveries, therefore it was not further used. The same water volume used in the previous experiments was taken for the orthogonal array design because it had been shown useful in mixtures with acetic acid and acetone. Due to different solvent volumes, water percentages changed from 14.3 to 33.3%, acetic acid percentages changed from 0.3 to 1.7%, and organic solvent percentages changed from 65.3 to 85.3%, covering the values found in the references [25–27,37,38].

The average recoveries were used as the variable to optimize. Two output variables were chosen to be optimized due to dual methyl ester formation [20], and the distinct orthogonal array

Table 7
Pooled ANOVA for the regular analysis of the average recoveries for acids, and basics and neutrals

Variation source	A. Solvent+ water	B. %Acetic acid	C. Volume	D. Shaking time	Residual	Total
Degrees of freedom	2	2	2	2		8
Acids						
Sum of squares	313.14	293.88	10.01	10.88		1260.59
Variance ratio (F) ^a	87.42	82.05				
Pool	No	No	Yes	Yes	Yes	
Pooled sum of squares	619.11	580.59			60.89	1260.59
Contribution (%) ^b	49.11	46.06			4.83	100.00
Basics and neutrals						
Sum of squares	1055.34	65.30	441.03	3.99		1567.96
Variance ratio (F) ^a	923.58	57.15	385.96			
Pool	No	No	No	Yes	Yes	
Pooled sum of squares	1054.20	64.16	439.89		9.71	
Contribution (%) ^b	67.23	4.09	28.05		0.62	100.00

^a Critical variance ratio for a 95% confidence level is 19.00.

^b Contribution is defined as $100 \times (\text{pooled sum of squares}/\text{total sum of squares})$.

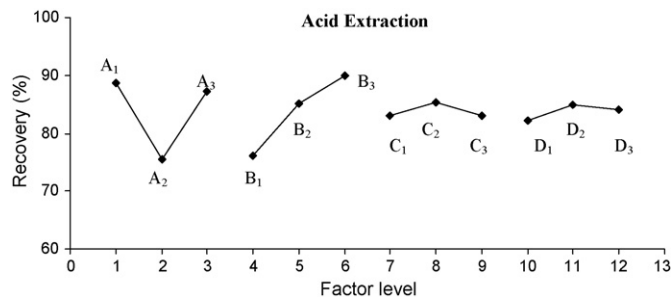


Fig. 4. Effect of the interaction of control factors on the mean response for acid recovery.

designs developed for acidic analytes and for basic and neutral herbicides. Table 4 shows the design matrix ($L_9(3^4)$) and the average recovery data obtained by duplicate for each of the nine experiments. For the regular analysis, an ANOVA table with pooled errors was calculated from these experimental data in order to identify individual sources of variation and to calculate the contribution of each factor to the response variation (Table 7).

ANOVAs of the recovery data obtained for both matrices revealed that factor A, the type of solvent, contributed by the highest percentage to the variability of the recoveries (49.1% for acids and 67.2% for basics and neutrals). Maximum recovery for all the analytes was obtained for level A_1 , acetone (Figs. 4 and 5). In contrast to acetone and acetonitrile, ethyl acetate was practically immiscible with water which could be easily removed by using only anhydrous Na_2SO_4 as a drying agent. However, the dichloromethane partition was also carried out in order to develop all experiments in the same way and to benefit from the polar interference removal provided by the partitioning. In addition to the variability in recoveries due to the immiscibility of ethyl acetate with water and acetic acid, pesticides with a thioether group (ureas) have been reported to degrade in the ethyl acetate [39], which explains the lower recoveries observed while using this solvent.

Acidic herbicides were very influenced by the acetic acid percentage (46.1%), meanwhile the contribution for basic and neutral was low (4.1%). Maximum recovery of the acid herbicides was obtained for level B_3 (2% acetic acid), meanwhile level B_1 (0.5% acetic acid) provided the maximum recovery for basics and neutrals (Figs. 4 and 5). Soil pH in combination with organic solvent–water–acetic acid mixtures was measured by

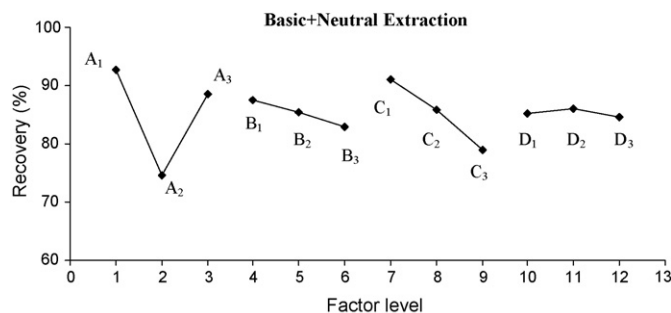


Fig. 5. Effect of the interaction of control factors on the mean response for basic and neutral recovery.

adding a proper volume of water in order to reach a 1:2.5 ratio (g of soil:ml of water) [24], as already stated in the previous tests. The addition of acetic acid decreases soil pH from 8.5, to 5.7 with 0.5% acetic acid, 5.2 with 1% acetic acid, and 5.0 with 2% acetic acid. The soil pH regulates the electrostatic charge of soil colloids and the chemical dissociation or protonation of herbicide molecules that controls the behaviour and degradation of herbicides in soils [40]. Carboxylic phenoxyacids and sulfonylurea herbicides behave as weak acids and do not ionize completely, existing in their ionic forms in most agricultural soils [28]. 1% acetic acid was chosen because it created a mild acid environment. Adsorption modifications with pH are moderate for the neutral molecules, being mainly retained by the soil organic matter, but they are very important for the charged molecules, especially for the anionic ones [40]. If pH decreases too much, acidic herbicide anions become protonated, reducing the repulsive forces present when the molecule is dissociated [37], thus increasing molecular adsorption [40]. On the other hand, basic herbicides protonate at low pH becoming cations and are stronger adsorbed by electrostatic interactions on negatively charged soil colloids, clays and organic matter [41,42].

No pH adjustment was used prior to the dichloromethane use because the use of acetic acid was found to enhance significantly the acidic recovery in the partitioning step. Medium polarity organic solvents have lower dielectric constants, and they are weaker bases than water; therefore, they differ in their ability to dissociate ions, which cause differences in pK_a between water and water–solvent mixtures [35]. Neutral weak acids such as acetic acid typically get weaker, and the pK_a becomes larger. This effect will also affect acid herbicides, their pK_a s becoming larger providing their partition in the organic solvent from the aqueous phase with no prior pH adjustment. Basic herbicides suffer from the contrary effect, their pK_a s becoming weaker, and therefore their protonation was produced at an aqueous pH much lower than the aqueous pK_a value of the base, being also recovered [43,44].

In addition, the use of acetic acid had a protective effect because it interacted with the active sites in the injection port and the column *via* hydrogen bonding therefore improving responses of herbicides susceptible to thermodegradation enabling the direct GC–MS analysis [39], especially important for phenylureas by minimizing their thermal decomposition [45].

Solvent volume was significant for basics and neutrals (28.1%) due to their volatility; however, this factor was pooled for acids. The maximum recovery was obtained for level C_1 , 15 ml, for basics and neutrals. An equivalent volume of 8 g of soil was taken to near dryness in all the tests, therefore more extract volume was concentrated when using 30 and 45 ml of solvent, leading to a higher loss of more volatile analytes, even after adding 20% of ethylene glycol in acetone as a holder solution when evaporating. However, solvent volume had no statistically significant effect (at 95% confidence level) on the acid recoveries. Acids are not lost during evaporation in the same way as basics and neutrals, because they are taken to near dryness in their non-volatile acidic form and converted to the more volatile methyl esters/ethers just before analysis. As a compromise between both types of analytes, level C_2 , 30 ml, was

Table 8

Linearity coefficients, recoveries (%) and relative standard deviations (RSD) for the four spiking level soil blank samples extracted with the optimized procedure

Number	Compound	Linearity coefficient	Recovery at 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	%RSD ($n=5$)	Recovery at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	%RSD ($n=5$)	Recovery at 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$	%RSD ($n=5$)	Recovery at 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$	%RSD ($n=5$)
1	Dicamba	98.04	105.78	8.10	86.96	2.37	91.72	2.75	92.86	3.29
2	2,4-D	97.40	86.62	7.00	91.19	3.10	90.54	1.73	88.51	3.45
3	MCPPP	98.81	92.86	5.32	97.97	4.64	97.14	2.65	95.04	4.77
4	Dichlorprop p	97.56	103.67	5.89	101.10	2.98	102.23	0.36	96.98	4.35
5	MCPA	98.13	85.98	5.61	95.85	3.70	89.96	2.42	92.90	3.18
6	Amidosulfuron	95.58	71.67	7.43	88.83	4.87	78.28	8.24	85.37	3.78
7	Tribenuron methyl	97.43	88.29	2.43	101.81	4.95	98.62	1.68	104.67	3.40
8	Fenoxaprop p	96.92	75.40	6.21	81.24	3.94	84.26	3.38	84.64	4.26
9	Diclofop	99.32	88.25	3.94	100.43	4.65	100.95	3.02	101.93	4.30
10	Flamprop	99.44	103.55	3.55	98.85	2.00	101.93	4.30	102.08	2.73
11	Bromoxynil	98.23	96.04	5.19	98.47	4.01	96.13	2.68	99.88	2.18
12	Ioxynil	98.55	99.18	1.97	98.38	7.16	99.91	3.36	96.92	3.13
13	Cyanazine	96.63	95.08	5.80	100.58	5.86	100.34	2.89	108.81	1.19
14	Terbuthylazine	98.05	89.49	5.06	103.74	2.39	105.04	3.97	106.18	1.54
15	Terbutryn	99.28	88.62	4.36	96.69	4.79	96.44	0.95	98.05	1.18
16	Metribuzin	97.84	88.38	2.58	95.04	4.12	98.70	2.96	104.58	4.16
17	Carfentrazone ethyl	96.15	94.17	2.52	91.94	0.83	92.15	4.77	100.60	1.86
18	Metoxuron	98.23	85.34	5.94	97.83	2.40	95.30	3.57	99.09	7.33
19	Isoproturon	95.31	93.76	5.61	103.09	5.42	93.00	3.20	102.66	4.31
20	Chlortoluron	97.08	94.46	4.84	102.83	6.05	97.28	1.16	103.57	5.41
21	Methabenzthiazuron	98.04	77.16	6.56	95.46	3.03	97.31	4.62	102.73	6.04
22	Linuron	96.44	90.81	5.89	96.97	2.01	94.40	6.39	102.55	7.33
23	Tralkoxydim	97.17	91.78	1.65	91.79	5.49	89.51	11.11	95.22	2.65
24	Flamprop isopropyl	97.91	100.92	4.48	98.83	3.09	98.58	3.68	103.18	4.96
25	Mefenpyr diethyl	99.01	102.78	6.06	96.24	5.84	102.64	2.55	103.52	4.44
26	MCPA tioethyl	98.16	90.02	2.45	98.05	3.38	103.53	5.50	104.48	1.88
27	Bifenox	97.48	102.30	2.10	100.93	1.17	99.65	2.10	105.30	0.57
28	Fenoxaprop p ethyl	96.66	90.91	4.51	91.02	2.18	95.55	3.93	103.71	1.40
29	Diclofop methyl	95.74	101.66	0.63	94.07	5.08	97.01	4.11	106.77	4.46
30	Prosulfocarb	98.42	87.76	3.65	97.81	3.44	100.97	5.78	105.64	1.19
31	Triallate	93.89	103.41	2.56	90.55	4.18	92.61	1.67	106.15	0.87
32	Diffufenican	98.61	108.48	6.37	102.60	2.19	103.60	3.75	106.42	4.93
33	Pendimethalin	98.52	97.47	2.58	89.19	3.20	91.98	5.04	94.30	2.20
34	Trifluralin	95.33	82.52	4.83	90.08	7.90	95.55	2.69	107.97	1.62
35	MCPPP isoctylic	98.08	98.39	1.93	93.43	3.26	100.00	5.69	104.31	3.58
36	Bromoxynil octanoate	98.85	99.38	2.57	93.65	4.18	94.28	3.01	96.24	4.92
37	Ioxynil octanoate	96.39	96.46	6.08	92.82	2.40	93.24	4.85	101.10	6.88

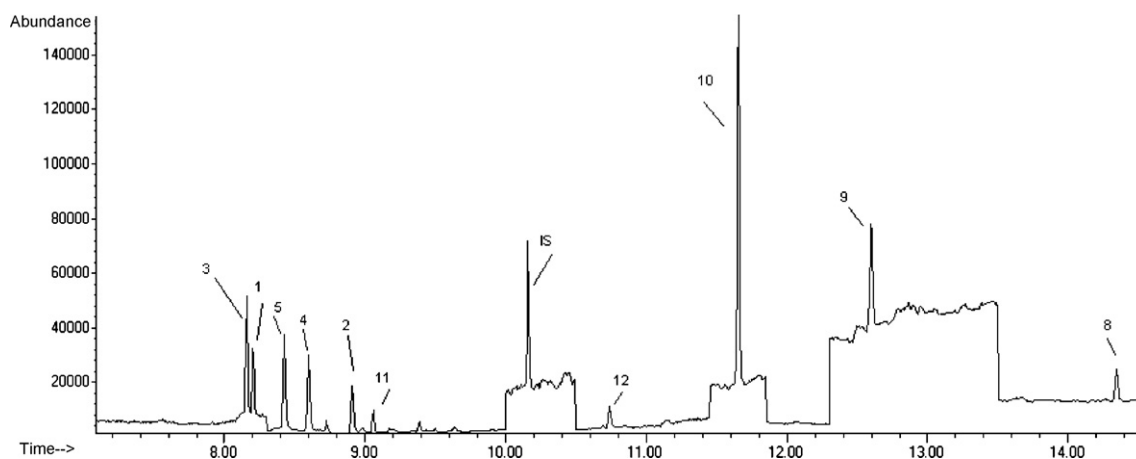


Fig. 6. Total ion chromatogram of a blank soil spiked with the acidic herbicides at the LOQ level, extracted with the optimized procedure, and derivatized to their methyl esters/ethers with TMSH addition prior to analysis by GC–MS. Peaks are numbered as herbicides in tables. I.S., Internal standard—alachlor.

selected. The main advantage of acetone over ethyl acetate and acetonitrile was its greater volatility, having the smallest boiling point (56.2 °C for acetone, 77.1 °C for ethyl acetate and 81.6 °C for acetonitrile) and therefore, minimizing volatile losses due to evaporation.

The time of extraction was negligible indicating that there were no significant differences (at 95% confidence level) among the levels tested, its contribution being pooled for all the analytes. Level D₂, 30 min, was chosen, because it gave a slightly higher response than 15 min.

The contribution of the residual error to the recovery variability (4.8% for acids and 0.6% for basics and neutrals) indicates the experimental design took into account all the variables affecting the response, the levels tested were fit for the purpose and the variance of the experimental data was explained by the effect of factors and interactions.

Fig. 4 (acid matrix) and Fig. 5 (basic and neutral matrix) show the effects of control factor levels on the output variable. It was noted that variation of the factor D (shaking time) had a slight influence on the recovery value, and a change in their level produced very small variation in the multiresidue herbicide extraction. However, the significant influence of the solvent type for all analytes, the acetic acid percentage for acids and the

solvent volume for basics and neutrals can be observed by the statistically different recoveries obtained when changing these variables.

3.3. Method validation

The validation of the optimized procedure included the study of linearity, limits of detection and quantification, matrix effect evaluation, recovery tests, ruggedness studies and uncertainty calculation [16]. Every experiment was carried out with a blank of the process and a soil blank, in order to verify the absence of herbicides.

The linearity of the analytical optimized procedure was tested with matrix-matched standard calibrations. Linear calibration curves were obtained for all compounds analyzed by GC–MS over the whole range (10–500 µg/l) tested at six levels. The fit of the calibration function was plotted and inspected visually but it was also numerically tested by calculating the linearity coefficients with the slope and its deviation ($r = (1 - S_b/b) \times 100$). All the analytes showed good linearity coefficients, i.e. above a value of 95. The analytical results are shown in Table 5. Only coefficients corresponding to matrix-matched calibrations prepared in soil blank extracts processed with the optimized

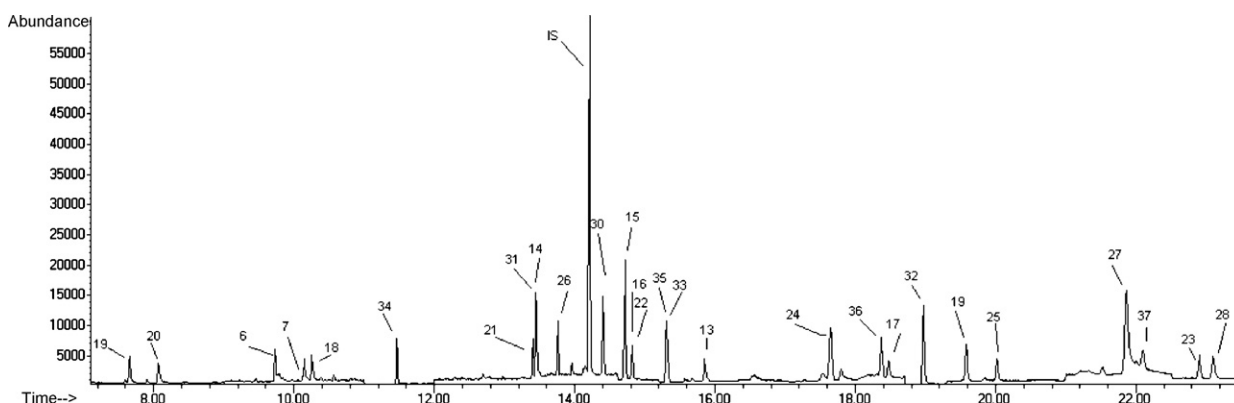


Fig. 7. Total ion chromatogram of a blank soil spiked with basic and neutral herbicides at the LOQ level, extracted with the optimized procedure and directly analyzed by GC–MS. Peaks are numbered as herbicides in tables. I.S., Internal standard—alachlor.

Table 9

Linearity coefficients (matrix-matched calibration), recoveries and uncertainties (U) for the four different types of soil spiked at 50 µg kg⁻¹ and extracted with the optimized procedure

Number	Compound	Soil 1		Soil 2		Soil 3		Soil 4	
		Linearity coefficient	Recovery at 50 µg kg ⁻¹ ± U	Linearity coefficient	Recovery at 50 µg kg ⁻¹ ± U	Linearity coefficient	Recovery at 50 µg kg ⁻¹ ± U	Linearity coefficient	Recovery at 50 µg kg ⁻¹ ± U
1	Dicamba	99.26	86.96c ± 7.03	99.32	84.70c ± 6.85	98.84	103.79a ± 8.39	99.34	94.54b ± 7.64
2	2,4-D	96.73	91.19ab ± 7.42	98.48	79.75b ± 6.48	98.31	99.33a ± 8.08	98.37	86.85b ± 7.06
3	MCPP	98.76	97.97a ± 7.51	99.08	104.88a ± 8.04	99.52	104.79a ± 8.03	99.20	106.51a ± 8.16
4	Dichlorprop p	98.81	101.10ab ± 6.93	99.00	96.32b ± 6.61	98.76	107.26a ± 7.36	98.94	103.43ab ± 7.09
5	MCPA	98.48	95.85b ± 6.35	99.01	79.11c ± 5.24	98.72	107.53a ± 7.12	99.54	104.64ab ± 6.93
6	Amidosulfuron	98.37	88.83bc ± 9.02	98.45	83.67c ± 8.50	99.07	85.87c ± 8.72	99.16	100.40a ± 10.20
7	Tribenuron methyl	96.21	101.81a ± 7.97	97.53	103.55a ± 8.10	99.60	103.28a ± 8.08	99.46	101.94a ± 7.98
8	Fenoxaprop p	99.46	81.24a ± 5.88	98.50	77.07a ± 5.58	98.47	82.47a ± 5.97	99.43	84.57a ± 6.12
9	Diclofop	98.63	100.43a ± 7.20	98.97	107.37a ± 7.70	98.90	104.26a ± 7.47	99.74	106.65a ± 7.65
10	Flamprop	98.56	98.85a ± 5.93	98.42	91.51a ± 5.49	98.66	100.43a ± 6.03	99.13	99.21a ± 5.96
11	Bromoxynil	96.55	98.47a ± 6.64	98.29	104.92a ± 7.07	98.92	106.18a ± 7.16	99.01	99.39a ± 6.70
12	Ioxynil	99.13	98.38a ± 9.52	98.12	108.74a ± 10.52	98.31	106.41a ± 10.29	99.03	105.26a ± 10.18
13	Cyanazine	98.40	100.58a ± 8.82	98.86	106.35a ± 9.33	99.12	105.80a ± 9.28	99.45	103.67a ± 9.09
14	Terbuthylazine	98.33	103.74a ± 6.36	98.50	103.97a ± 6.37	99.01	104.63a ± 6.41	99.12	105.94a ± 6.49
15	Terbutryn	97.87	96.69a ± 7.60	99.01	102.51a ± 8.05	99.41	97.38a ± 7.65	99.67	100.42a ± 7.89
16	Metribuzin	96.77	95.04a ± 6.60	98.48	103.06a ± 7.16	98.76	99.76a ± 6.93	99.33	103.98a ± 7.22
17	Carfentrazone ethyl	97.04	91.94b ± 5.97	97.64	102.51a ± 6.66	98.58	106.41a ± 6.91	99.13	99.02ab ± 6.43
18	Metoxuron	99.31	97.83a ± 8.59	98.61	93.39a ± 8.20	99.00	106.44a ± 9.35	99.38	102.36a ± 8.99
19	Isoproturon	99.03	103.09a ± 8.45	99.76	94.74a ± 7.77	98.50	103.38a ± 8.47	99.07	93.64a ± 7.68
20	Chlortoluron	99.17	102.83a ± 8.69	98.76	96.73a ± 8.17	98.32	98.38a ± 8.31	98.90	99.77a ± 8.43
21	Methabenzthiazuron	97.79	95.46ab ± 7.30	97.29	89.32b ± 6.83	98.74	103.39a ± 7.91	99.09	96.46ab ± 7.38
22	Linuron	97.41	96.97ab ± 8.67	98.39	92.65b ± 8.28	98.28	90.32b ± 8.07	98.11	103.80a ± 9.28
23	Tralkoxydim	98.43	91.79b ± 12.09	98.80	99.39b ± 13.09	98.45	97.48b ± 12.84	99.43	108.06a ± 14.23
24	Flamprop isopropyl	98.59	98.83ab ± 6.03	97.27	90.21b ± 5.51	99.29	103.85a ± 6.34	99.58	100.39ab ± 6.13
25	Mefenpyr diethyl	97.46	96.24bc ± 7.94	97.71	90.40c ± 7.46	99.24	105.60ab ± 8.72	99.72	103.72ab ± 8.56
26	MCPA tioethyl	98.37	98.05bc ± 6.62	99.07	105.10ab ± 7.10	99.18	108.07a ± 7.30	99.44	95.31c ± 6.44
27	Bifenox	96.50	100.93ab ± 5.17	96.89	91.92c ± 4.71	97.21	107.45a ± 5.50	98.79	96.72bc ± 4.95
28	Fenoxaprop p ethyl	97.06	91.02b ± 5.53	98.00	97.04ab ± 5.89	98.82	96.87ab ± 5.88	99.44	99.84a ± 6.06
29	Diclofop methyl	97.95	94.07b ± 7.08	98.78	103.98a ± 7.83	99.25	101.70ab ± 7.65	99.69	103.69a ± 7.80
30	Prosulfocarb	98.04	97.81a ± 6.71	98.70	104.47a ± 7.17	99.34	102.82a ± 7.06	99.59	100.19a ± 6.88
31	Triallate	97.96	90.55a ± 6.21	99.30	96.02a ± 6.59	99.27	95.72a ± 6.57	99.41	96.82a ± 6.64
32	Diffenican	97.59	102.60a ± 7.19	98.39	104.88a ± 7.35	99.19	106.19a ± 7.45	99.72	102.28a ± 7.17
33	Pendimethalin	96.49	89.19b ± 5.61	96.81	97.77ab ± 6.15	97.16	100.14a ± 6.30	99.07	97.99ab ± 6.16
34	Trifluralin	97.22	90.08a ± 9.37	98.03	88.00a ± 9.15	98.09	90.30a ± 9.39	99.04	97.56a ± 9.10
35	MCPP isocytic	98.21	93.43b ± 6.75	98.72	106.28a ± 7.68	99.25	103.38a ± 7.47	99.63	104.49a ± 7.55
36	Bromoxynil octanoate	97.52	93.65b ± 6.32	98.09	105.02a ± 7.09	99.01	103.39a ± 6.98	99.52	104.51a ± 7.06
37	Ioxynil octanoate	96.67	92.82a ± 7.87	96.34	89.69a ± 7.61	98.04	96.60a ± 8.19	98.06	99.90a ± 8.47

Soil characteristics		Soil 1	Soil 2	Soil 3	Soil 4
(1)	Organic matter (%)	0.69	1.66	>2.50	0.905
(2)	Clay (%)	17.00	63.00	60.00	2.00
(3)	Silt (%)	37.00	3.00	24.00	3.00
(4)	Sand (%)	46.00	34.00	15.60	95.00
(5)	CEC (meq/100 g)	9.20	15.90	5.26	5.30
(6)	Soil pH	8.50	8.20	6.00	8.04
(7)	(Soil + solvent) pH	5.20	5.19	3.92	5.04

Means followed by different letters (a–c) in the same row are significantly different at $p < 0.05$ level according to Tukey honest test for equal number of replicates.

procedure have been represented due to the high amount of data.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was estimated with the slope and calibration deviation ($LOD = kS/b$, where k takes a value of 3.29) [46] of the matrix-matched calibrations prepared with soil blank samples extracted with the optimized procedure. The limit of quantitation (LOQ) is the lowest concentration of analyte that can be determined with an acceptable level of repeatability, precision and trueness. It was estimated in the same way as the LOD with a k value of 10. LOQ values found for all herbicides (Table 5) were smaller than the proposed limit of determination (0.05 mg/kg) for analytical methods for parent compounds and/or relevant metabolites in soils [10].

The presence or absence of matrix effects was demonstrated by comparing the response produced from the analyte in an acetone acidified with 1% acetic acid solution with that obtained from the same quantity of analyte in the presence of the matrix extract at the same levels of calibration. Values of both calibrations could be linearly fitted if both responses had no significant differences and, therefore, the intercept of this new fitting would be statistically equal to 0 (intercept intervals would include this value) and the slope would be statistically equal to 1 (slope intervals would include this value). The less precise calibration values were placed in the Y -axis. Only the slope and its interval are shown in Table 5 because of the high amount of data. Matrix effect was found for all of the herbicides extracted by the optimized procedure, even including the dichloromethane partition which removes some polar interferences. Therefore, all analytes were quantified with matrix-matched standard calibrations in order to avoid wrong quantification, which is in agreement with the EU recommendations [16].

The validation of the optimized procedure included recovery tests for each herbicide using matrix-matched calibrations for quantification prepared with soil blank samples extracted with the optimized method. They were performed at four different concentrations intended to cover the herbicide residue concentrations expected in real samples: 25, 50, 150 and 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was chosen to check acceptable recovery and precision data for control samples fortified at a level near the LOQ for most herbicides. 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ level is the proposed limit of determination (0.05 mg/kg) set by the Council Directive 91/414/EEC. The average recoveries of five replicates are shown in Table 8. Fig. 6 shows the total ion chromatogram of a blank soil spiked with the acidic herbicides at the LOQ level, extracted with the optimized procedure, and derivatized to their methyl esters/ethers with TMSH addition prior to analysis by GC–MS, while Fig. 7 shows the total ion chromatogram of the basic and neutral herbicides extracted with the same procedure at the LOQ level, but directly analyzed by GC–MS. Recoveries of herbicides at every spiking level were in the range of 70–110% [16]. Differences due to analyte concentration among the spiking levels were minimal in terms of recovery for nearly all analytes and satisfactory precision values were observed (i.e. $RSD < 22\%$, for the first two low concentrated levels, and $RSD < 14\%$, for the more concentrated levels [16]). The lin-

earity of the extraction was also checked by calculating the linearity coefficients over the range (25–250 $\mu\text{g}/\text{l}$) tested at the four spiked levels. All the analytes showed good linearity coefficients, except for triallate ($n = 31$), which was slightly lower than 95 (Table 8).

Representative agricultural soils with different characteristics (Table 9) were taken in order to check whether the pH provided by the solvent mixture was also useful in these conditions, taking into account that agricultural soil pH values normally varies between pH 5.5 and 7.5 [28,47]. pH soil–solvent measurements were obtained as previously described. Soil 1 was the soil used during all the optimization and orthogonal array design process. Soil 2 contained more clay if compared to Soil 1 and 4. Soil 3 was selected because it had the highest content in clay and organic matter together with the more acidic pH. Soil 4 was used as a control because it was mainly composed of sand. Matrix-matched standard calibrations were prepared with the different soils to check for linearity. All herbicides in every soil showed good linearity coefficients over the whole range (10–500 $\mu\text{g}/\text{l}$) tested at six levels. Therefore, a proper quantification with matrix-matched calibrations prepared in blank samples of different soils was suitable. They were spiked at 0.05 mg/kg and extracted with the optimized method to check for suitability. The average recoveries of 5 replicates are shown in Table 9. Means followed by different letters in the same row are significantly different at $p < 0.05$ level according to Tukey honest test for equal number of replicates. Recoveries were not found to depend on the type of soil for 19 herbicides out of 37. The highest recoveries for the more acidic analytes were significantly obtained in Soil 3 due to its more acidic pH. A high clay content and organic matter did not seem to diminish the recovery efficiency of analytes as previously reported [40]. Basic analytes were not significantly affected by the type of soil. Neutral adsorption was supposed to be more affected by the organic content but this effect was not observed either [40].

It can be concluded that, the acetic acid addition was proved useful in creating a compromise pH range, at which both, the quantitative extraction of acid herbicides and the adequate extraction of basic and neutral herbicides, were sufficiently achieved.

Finally, the relative uncertainty was calculated for the four spiked levels, covering the validated range of the optimized procedure [48]. The highest relative uncertainty found for each herbicide within the four spiked levels was used for all calculations. Most of the relative uncertainties were lower than 10% for all of the herbicides.

4. Conclusions

The mechanical shaking of treated soils with water, acetic acid and acetone solutions has been shown to be satisfactory for the overall extraction of a wide range of herbicides. The statistical analysis of the orthogonal array design revealed that all the factors were significant being the time of extraction the less important, therefore selecting 30 min of orbital shaking. As expected, the type and ratio of solvent was the most important factor for the neutral and basic analytes meanwhile acidic herbi-

cides were also influenced by the acetic acid percentage. A 30 ml volume of solvent was chosen because higher volumes led the more volatile basic and neutral herbicides to be lost during the concentration step. Acetone was the solvent that provided the best recoveries and 1% acetic acid was chosen because it created a mild acid environment. It enhanced overall ionic analyte recoveries while, at the same time, sufficiently acidifying the aqueous phase prior to the partitioning into an organic solvent immiscible with water in order to properly recover acidic herbicides, otherwise lost in the aqueous phase, and with no detriment in basic and neutral extraction. In addition acetic acid was found to have a protective effect because it interacted with the active sites in the injection port and the column therefore improving responses of herbicides susceptible to thermodegradation enabling the direct GC analysis. The contribution of the residual error was smaller than 10% ensuring that the experimental design took into account all the variables affecting the response. The method was validated in the 25–250 µg/kg range, providing an overall recovery value of 70–110% and good precision for acid, basic and neutral compounds.

Acknowledgement

The authors wish to thank the Agrarian Technological Institute of “Castilla y León” for financial support.

References

- [1] Document No. SANCO/D3/SI2.396179, Final Report, European Union, Brussels, 2005.
- [2] Document No. D/00/SuM/5277, European Crop Protection Association, Brussels, 2000.
- [3] M.J. Santos-Delgado, E. Crespo-Corral, L.M. Polo-Díez, *Talanta* 53 (2000) 367.
- [4] D.H. Roberts, T.R. Hutson, *Herbicides* 6 (1987).
- [5] M.J.M. Wells, L.Z. Yu, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 237.
- [6] Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs. Part I. General Inspectorate for Health Protection, sixth ed., Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, 1996.
- [7] W.L. Budde, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 1.
- [8] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 175.
- [9] G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 463.
- [10] Council Directive No. 91/414/EEC, OJ L 230 (1991) 1.
- [11] Document No. SANCO/825/00, rev.7, European Union, Brussels, 2004.
- [12] J. Tekel, J. Kovacicová, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 291.
- [13] C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *Quim. Anal.* 15 (1996) 53.
- [14] E. Kremer, M. Rompa, B. Zygumt, *Chromatographia* 60 (2004) 169.
- [15] H.B. Wan, W.G. Lan, M.K. Wong, C.Y. Mok, Y.H. Poh, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 255.
- [16] Document No. SANCO/10232/2006, European Union, Brussels, 2006.
- [17] The FOOTPRINT Pesticide Properties DataBase, Database Collated by the University of Hertfordshire as Part of the EU-Funded FOOTPRINT Project (FP6-SSP-022704), 2006.
- [18] S. Marchese, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 393.
- [19] J. Patsias, E.N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 153.
- [20] C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 244.
- [21] M.H. Kovacs Jr., *Residue Rev.* 97 (1986) 1.
- [22] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, A.I. García-Valcárcel, L. Martínez, R.A. Pérez, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 347.
- [23] S. Menasserri, W. Koskinen, P.Y. Yen, *Pest. Manage. Sci.* 60 (2004) 297.
- [24] M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcárcel, J.L. González, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4265.
- [25] A.W. Ahmed, M.V.N. Bertrand, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (1989) 365.
- [26] A.E. Smith, L.J. Milward, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1981) 633.
- [27] C. Crescenzi, G. D’Ascenzo, A. Di Corcia, M. Nazzari, S. Marchese, R. Samperi, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2157.
- [28] A.E. Smith, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 59 (1995) 97.
- [29] M. Anastasiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- [30] E. Papadopoulou-Mourkidou, J. Patsias, A. Kotopoulou, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 447.
- [31] EPA Method 8151A Chlorinated Herbicides by GC using methylation or pentafluorobenzoylation derivatization. Revision 1, December 1996.
- [32] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martin, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 756.
- [33] Decision No. 2002/657/EC, European Union, Brussels, 2002.
- [34] Document No. OPPTS 860.1340, US Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC, 1996.
- [35] G.W. Tindall, *LC-GC N. Am.* 20 (2002) 11.
- [36] C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, E. Miguel, J.L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 17.
- [37] C.W. Thorstensen, A. Christiansen, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4199.
- [38] D.J. Sutherland, G.K. Stearman, M.J.M. Wells, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 14.
- [39] K. Mastovska, S. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 259.
- [40] E. Barriuso, C. Feller, R. Calvet, C. Cerri, *Geoderma* 53 (1992) 155.
- [41] J.U. Holthius, R. Baumbach, S. Friebe, G.J. Kraus, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 66 (1997) 269.
- [42] A. Lagana, G. Fago, A. Marino, *Anal. Chem.* 70 (1998) 121.
- [43] S. Espinosa, E. Bosch, M. Roses, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5183.
- [44] I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Roses, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1802.
- [45] M.C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 79.
- [46] L.A. Currie, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1699.
- [47] W. Kordel, G. Kotthoff, J. Müller, *Chemosphere* 30 (1995) 1373.
- [48] S.L.R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams (Eds.), Guide No. 4, second ed., Eurachem/Citac, 2000.