

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE GANDÍA
INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL



**ESTUDIO DE SISTEMAS DE EXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA PARA SU APLICACIÓN EN LA
DETERMINACIÓN DEL PLAGUICIDA
DIMETOATO**

TRABAJO FINAL DE CARRERA

Autora:

Andrea Peña Badenas

Directores:

Mónica Catalá Icardo

José Luis López Paz

GANDÍA, 2011

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Plaguicidas en el medio forestal	3
1.2	Dimetoato en el medio forestal	4
1.2.1	<i>Características generales</i>	4
1.2.2	<i>Toxicidad en el ser humano</i>	4
1.2.3	<i>Métodos de análisis del plaguicida dimetoato.</i>	5
1.3	Análisis por inyección en flujo	7
1.3.1	<i>Elementos del sistema FIA</i>	7
1.3.2	<i>Características de los métodos FIA</i>	8
1.4	Quimioluminiscencia	9
1.5	Combinación FIA - quimioluminiscencia	10
1.6	Pretratamiento de la muestra: Sistemas de extracción en fase sólida	11
1.6.1	<i>Interacción analito-adsorbente</i>	12
1.6.2	<i>Características de los sistemas SPE</i>	13
1.6.3	<i>Procedimiento de extracción</i>	14
1.6.4	<i>Empleo de SPE en la determinación de plaguicidas</i>	15
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
2.1.	Objetivos	19
2.2.	Plan de trabajo	19
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1	Reactivos	23
3.2	Cartuchos de SPE	24
3.3	Aparatos	24
3.3.1	<i>Instrumental del trabajo experimental</i>	24
3.3.2	<i>Elementos del sistema FIA-CL</i>	24
3.4	Determinación del dimetoato: sistema FIA-CL	25
4.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	29
4.1	Efecto de los disolventes orgánicos en el sistema FIA-CL	31
4.2	Selección del sistema del adsorbente para la SPE	34
4.3	Optimización de variables del SPE	37
4.4	Estudio de interferentes	38
4.5	Resumen del Sistema optimizado de extracción en fase sólida	40
5.	MUESTRAS REALES.....	43
6.	CONCLUSIONES.....	49
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plaguicidas en el medio forestal

El uso de plaguicidas está muy extendido, tanto en el medio forestal como en el medio agrícola, debido a la necesidad de combatir plagas animales y vegetales. Sin embargo, la sobreutilización de los mismos conlleva graves problemas medioambientales, como la aparición de resistencias en las plagas. Además, los plaguicidas son compuestos muy tóxicos y no siempre selectivos, afectando a otras especies a las que inicialmente no estaban destinados y desequilibrando los sistemas biológicos.

El uso reiterado de plaguicidas y en concentraciones más elevadas de lo establecido, puede producir que la planta no absorba el compuesto, y termine acumulándose en el suelo y en los vegetales, siendo arrastrado por la lluvia y contaminando tanto aguas superficiales como subterráneas, así como los organismos que viven en ella.

El análisis de plaguicidas en muestras medioambientales es un requisito imperativo para asegurar la calidad de los recursos naturales. Sin embargo, dada la complejidad de este tipo de muestras y las bajas concentraciones a las que se encuentran los plaguicidas en las mismas, es necesario el desarrollo de métodos cada vez más selectivos y sensibles para su análisis.

Habitualmente el análisis de los plaguicidas en muestras medioambientales se lleva a cabo empleando métodos de cromatografía líquida o gaseosa acoplada a diferentes sistemas de detección, especialmente la espectrometría de masas (MS). Sin embargo, estos equipos no están disponibles en cualquier laboratorio, dado el elevado coste de los mismos. Es por ello que resulta de gran interés el desarrollo de métodos alternativos más sencillos y económicos. En este sentido, la combinación análisis por inyección en flujo-quimioluminiscencia (FIA-CL), empleada como sistema de detección en el presente Proyecto Final de Carrera, aporta una elevada sensibilidad y selectividad con unos límites de detección muy bajos y amplios intervalos de aplicación. Anteriormente, este tándem ha sido aplicado con éxito en el análisis de alimentos¹, fármacos²⁻⁴ o plaguicidas⁵⁻⁸

1.2 Dimetoato en el medio forestal

1.2.1 Características generales

El dimetoato es un plaguicida organofosforado sistémico, esto es, un compuesto que es absorbido y transportado por el interior de la planta, siendo frecuentemente transformado en su interior en productos menos tóxicos o productos metabólicos con propiedades insecticidas y acaricidas. El nombre asignado por la IUPAC para el dimetoato es O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato y su estructura química se presenta en la figura 1.

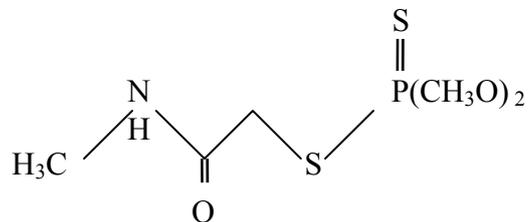


Figura 1: Estructura química del dimetoato.

Este plaguicida se usa contra insectos: áfidos, trips, saltamontes y moscas blancas en plantas ornamentales, aunque también se ha utilizado para la lucha contra la mosca del olivo⁹, además de en otros cultivos como cítricos.

El dimetoato es estable a la hidrólisis en medio ácido o neutro, con una vida media de 156 y 678 días a pH 5 y 7 respectivamente. Sin embargo, a pH 9, la vida media es de 4,4 días¹⁰. La degradación del dimetoato da lugar a O-desmetil-dimetoato y ácido O,O-dimetil hidrogeno fosforotioato¹¹.

Por regla general, la velocidad de hidrólisis de los pesticidas organofosforados es mayor en condiciones alcalinas, lo que sugiere que la reacción es más efectiva catalizada por radicales OH⁻ que por H₂O o H₃O⁺¹².

1.2.2 Toxicidad en el ser humano

La toxicidad en el ser humano¹⁰ puede ser:

- a) Aguda: La exposición durante breves periodos de tiempo causa los siguientes síntomas: entumecimiento, descoordinación, dolor de cabeza,

vértigo, dolores abdominales, visión borrosa, dificultad respiratoria, bradicardia. En dosis muy altas: inconsciencia, incontinencia, convulsiones y muerte.

- b) Crónica: En exposiciones largas, se produce: daño en la memoria, problemas de concentración, desorientación, depresión severa, irritabilidad, dolor de cabeza, dificultad al hablar, adormecimiento, náuseas, debilidad, pérdida del apetito y malestar.

1.2.3 Métodos de análisis del plaguicida dimetoato

El método más habitualmente empleado para llevar a cabo la determinación del dimetoato es la cromatografía gaseosa (GC) acoplada con detector de nitrógeno-fósforo^{13,14}, espectrómetro de masas (MS) de impacto electrónico^{15,16} o con un detector de fotometría de llama^{17,18}.

Sin embargo, la cromatografía líquida (LC) acoplada a la MS resulta más ventajosa cuando se trata de analizar compuestos polares, no volátiles o inestables térmicamente. Así, la combinación de la LC con la MS con ionización por electrospray¹⁹⁻²³ ha sido ampliamente utilizada por diversos autores en la determinación de dimetoato. Por otra parte, la combinación del análisis por inyección en flujo (FIA) con este sistema de detección, llevada a cabo por H. John y col.¹⁹ permitió incrementar la velocidad de inserción del método. Además, el elevado grado de dilución que el método desarrollado requirió, permitió que los potenciales interferentes presentes en la matriz de la muestra también se vieran diluidos, de modo que la selectividad del sistema FIA desarrollado fue comparable a la del método cromatográfico.

Aunque con menor frecuencia, la electroforesis capilar (EC) con detección por MS acoplada a una fuente de ionización de plasma (ICP) o con detección UV también ha sido empleada para la determinación de dimetoato²⁴⁻²⁵. Y. Chen y col.²⁶ han desarrollado un método de EC con detección por electroquimioluminiscencia. El sistema se basa en un electrodo eléctricamente calentado de tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II)/nanotubo de pasta de carbón de pared múltiple. El empleo de un electrodo calentado, proporcionó algunas ventajas frente al convencional electrodo a temperatura ambiente, tales como un incremento de sensibilidad, menor desviación estándar relativa y menor anchura de

pico. De hecho, el límite de detección pasó de 230 a 80 µg/l cuando la temperatura se incrementó desde 22 a 49°C.

También se han propuesto algunas estrategias no separativas para la determinación de dimetoato, tales como métodos polarográficos²⁷, voltamétricos²⁸ o amperométricos²⁹.

El único método quimioluminiscente previamente desarrollado se basa en la reacción entre ozono y el óxido de nitrógeno producido por pirolisis, a 1050°C, de dimetoato, así como de otros compuestos que contienen nitrógeno. El proceso de pirolisis se llevó a cabo sobre el efluente de un equipo de cromatografía supercrítica³⁰. La gráfica de calibrado obtenida por los autores fue lineal entre 2,96 y 850 ppm de nitrógeno y el límite de detección fue de 60 pg.

Por otra parte, la determinación de plaguicidas, incluso con técnicas separativas, habitualmente implica etapas previas tales como procesos de extracción y eliminación de interferencias. La extracción de los plaguicidas organofosforados de muestras de agua se lleva a cabo habitualmente mediante extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPEM) o con extracción por absorción en fase sólida usando barra agitadora (SBSE)³¹.

No obstante, las propiedades físico-químicas, tales como solubilidad en agua y coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}), de los diferentes compuestos organofosforados varían significativamente. Así, aquellos que presentan una elevada polaridad, y por tanto una gran solubilidad en agua, no se pueden extraer del agua con los procedimientos habituales basados en LLE, SPE, SPEM o SBSE.

Sin embargo, para la mayoría de los plaguicidas organofosforados, la SPE es la técnica de preconcentración y limpieza más habitual. Para mejorar la eficiencia en la retención de los compuestos más polares, se han desarrollado diversos adsorbentes hidrofílicos: Amberlite XAD-7 (resina polimérica adsorbente), Oasis HLB (copolímero macroporoso de divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona) o Porapak RDX (Copolímero de DVB-N-vinilpirrolidona), entre otros. No obstante, los adsorbentes más empleados son el C18, carbono negro grafitizado y PS-DVB (polímero de poli(estireno-divinilbenceno)) macroporoso.

En el caso del dimetoato, diversos adsorbentes han sido empleados con éxito en su SPE. Así, algunos autores han optado por empleo de cartuchos de C18³²⁻³⁶, mientras que otros han usado cartuchos Oasis HLB³⁷⁻³⁹ o Isolute ENV+^{40,41}.

1.3 Análisis por inyección en flujo

Como se ha comentado, el Análisis por Inyección en flujo (FIA) es una interesante alternativa para llevar a cabo la determinación de plaguicidas. Se trata de una técnica de automatización de las operaciones de laboratorio que fue desarrollado por los daneses Ruzicka y Hansen⁴² y simultáneamente por el americano Stewart⁴³ en 1975. Es un método en flujo continuo, lo que implica que la circulación de los analitos y reactivos no se detiene en ningún momento, impulsada por una unidad de propulsión (habitualmente una bomba peristáltica). Un volumen controlado de muestra es introducido en un portador que la transporta hasta el detector donde se mide una señal, que da un registro en forma de pico, de manera análoga a los métodos cromatográficos, cuya altura y área está relacionada con la concentración del analito. A esta representación gráfica, señal frente a tiempo, se le denomina fiagrama.

1.3.1 Elementos del sistema FIA

Los elementos básicos de cualquier sistema FIA son:

- a) Elemento de propulsión: Encargado de proporcionar el caudal deseado al flujo de disoluciones, lo que determinará el tiempo de reacción y la dispersión de la muestra. Es importante que el caudal suministrado por el sistema de propulsión sea muy reproducible. El sistema de propulsión más habitual es la bomba peristáltica, que consta de un tambor con rodillos sobre los que se acoplan unos tubos de teflón por los que circularán las disoluciones necesarias.
- b) Sistema de inyección: Inserta en el portador un volumen conocido, variable y reproducible de muestra, sin alterar el flujo. Para controlar el volumen de muestra, se puede variar el diámetro y la longitud del bucle utilizado.
- c) Zona de reacción: La muestra, los reactivos y el portador, circulan por el interior de unos tubos de teflón de diámetro conocido y cuya longitud se puede variar. En su interior, no solo se produce el transporte, sino también la reacción química de los analitos.

- d) Detector: La metodología FIA se puede acoplar a cualquier tipo de detector, siempre que la celda pueda adaptarse al trabajo en flujo continuo.

1.3.2 Características de los métodos FIA

a) Sensibilidad

La sensibilidad de los métodos FIA puede ser menor a la alcanzada con otros métodos en estático, debido a la dispersión de la muestra y a que los tiempos de reacción son menores, lo que conlleva rendimientos parciales de reacción. Además, los factores que favorecen la reacción, aumentan la dispersión y viceversa.

b) Selectividad

Al ser un sistema dinámico, la selectividad generalmente es mayor en estos sistemas que en los de tipo estático, ya que se logra un mayor control cinético gracias al control del caudal y de la longitud del reactor (que determinan el tiempo de reacción). Además, se pueden medir productos intermedios, que debido a la velocidad de reacción, no se podrían medir o reproducir en un sistema estático.

c) Precisión

El FIA es un sistema con unos valores de reproducibilidad y repetitividad muy elevados, debido a que se elimina el factor humano. De este modo la fiabilidad aumenta.

d) Rapidez

Se trata de sistemas rápidos, en los que habitualmente el mayor consumo de tiempo se debe a la preparación de las muestras y los reactivos. La puesta a punto del sistema oscila entre 5 y 10 minutos para estabilizar el flujo, y la velocidad de inserción puede alcanzar 200 h^{-1} .

e) Sencillez y versatilidad

Los elementos que conforman un sistema FIA son muy sencillos (tubos de teflón, conexiones, bifurcaciones) y de fácil montaje. Además la metodología resulta muy versátil, ya que se puede acoplar a cualquier sistema de detección.

f) Bajo coste

Los componentes del sistema FIA tienen un precio asequible que permite que el propio operador prepare y modifique la configuración del sistema tantas veces como desee, para adaptarse a las necesidades de cada análisis. Además, el consumo de reactivos es reducido, entre 20 y 100 veces menor a otras técnicas analíticas, minimizando de este modo el volumen de residuos de laboratorio.

1.4 Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia se puede definir como la emisión de radiación electromagnética producida por una reacción química. Esta modalidad de análisis se ha aplicado en diversos campos, tales como análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico y alimentario, control de calidad y otros. También ha sido utilizada en combinación con otras técnicas, como métodos electroforéticos, cromatográficos y sistemas FIA⁴⁴.

En el detector de quimioluminiscencia (luminómetro) no hay una fuente de excitación externa, por tanto, no hay dispersión de la señal, ni problemas de inestabilidad de la lámpara, y las interferencias por procesos de excitación no selectivos se ven reducidas. Así se consigue una instrumentación simple junto con una mejora clara de los límites de detección gracias a la ausencia de ruido.

La selectividad y linealidad dependen de la reacción quimioluminiscente, de la absorción o emisión de radiación por el analito y el producto o cofactores. En general los métodos quimioluminiscentes proporcionan una elevada sensibilidad y amplios rangos dinámicos.

Además, cuenta con una gran versatilidad, pudiendo ser utilizado en la determinación de una gran variedad de especies, entre las que se encuentran substratos, precursores de la quimioluminiscencia o reactivos para la reacción o catalizadores.

Sin embargo, como todo sistema, tiene sus limitaciones, ya que depende de factores ambientales y del tiempo de reacción.

Las reacciones quimioluminiscentes son de dos tipos: directas e indirectas. Las directas se producen como consecuencia de la reacción entre dos reactivos, un sustrato y un oxidante, que forman un producto excitado que se relaja emitiendo un fotón. En las reacciones indirectas, la energía se transfiere a un fluoróforo que es el que emite el fotón.

Los factores que afectan a la emisión de la radiación quimioluminiscente, son aquellos que influyen en el rendimiento cuántico y en la velocidad de reacción:

- La estructura química de la sustancia que promueve la quimioluminiscencia.
- Catalizadores.
- Temperatura.
- pH y fuerza iónica.
- Hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución.
- Presencia de aceptores de energía transferida.
- La presencia o no de sustancias interferentes, y que no producen quimioluminiscencia. Por eso es importante la adición de un método que sea capaz de eliminar estos interferentes de la muestra, aumentando la selectividad del método.

1.5 Combinación FIA - quimioluminiscencia

Dado que las reacciones quimioluminiscentes suelen ser muy rápidas y los productos generados muchas veces tienen periodos de vida muy cortos, la combinación con las modalidades en flujo continuo, tales como el FIA, resulta altamente interesante, ya que estas permiten un estricto control de las condiciones de trabajo, proporcionando una elevada reproducibilidad. La distancia entre la confluencia de los reactivos quimioluminiscentes y el analito hasta la celda de detección, y el caudal al que circulan las disoluciones, determinará el tiempo de reacción.

La celda de detección debe permitir el flujo continuo de las disoluciones. Habitualmente se emplean una celda en espiral plana, generalmente de cuarzo o de tubo de teflón, situada cerca del tubo fotomultiplicador, situada en frente del tubo fotomultiplicador, para que este recoja la máxima cantidad de luz emitida.

Por otra parte, la combinación análisis por inyección en flujo-quimioluminiscencia (FIA-QL), aporta una elevada sensibilidad y selectividad, con unos límites de detección muy bajos y amplios intervalos de aplicación, además de una elevada reproducibilidad.

1.6 Pretratamiento de la muestra: Sistemas de extracción en fase sólida

Para lograr la sensibilidad y selectividad que los métodos analíticos requieren, es habitual que estos se complementen con alguna técnica de extracción, tal como extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) o extracción con fluidos supercríticos (SFE).

Estos métodos se encargan de separar los analitos de la muestra original, consiguiendo gracias a ello una mejor selectividad, al eliminar los posibles interferentes que podamos encontrar en la muestra. Así mismo, pueden contribuir a mejorar la sensibilidad del método analítico, ya que si el volumen de muestra tratado es mayor que el volumen de extractante, el analito se concentra.

A pesar de las ventajas y desventajas de las diferentes alternativas, la comodidad y sencillez del empleo de la SPE hace que sea este sistema de extracción el preferido por muchos autores, siendo la técnica más usual para efectuar preconcentraciones de analitos en muestras ambientales^{45,46}.

En el presente Trabajo Final de Carrera, se ha utilizado la extracción en fase sólida como sistema de pretratamiento en la determinación del plaguicida dimetoato, por lo que esta sección se centrará principalmente en dicho sistema de extracción.

La SPE se basa en la partición selectiva o distribución de uno o más compuestos entre dos fases. La primera es un sólido adsorbente; la segunda fase suele ser un líquido, pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico. El objetivo principal de la SPE es separar selectivamente los analitos de interés de una muestra y la eliminación de la matriz interferente. Estos analitos pueden ser adsorbidos por el sólido, o bien permanecer en la otra fase siendo en este caso los compuestos interferentes los que quedarían retenidos en la fase sólida. En el primer caso, posteriormente los analitos podrán ser recuperados empleando un disolvente adecuado para su elución.

El adsorbente puede estar dispuesto en cartuchos o en discos (Figura 1). En los cartuchos el adsorbente está recubriendo un soporte mientras que en los discos está

inmovilizado en una membrana de microfibras. Los discos son de 0,5 mm de espesor y permiten flujos más elevados que los empleados con los cartuchos⁴⁷.



Figura 2: Tipos de presentaciones de los adsorbentes.

La selección del adsorbente es un factor muy importante, que dependerá del analito y de sus grupos funcionales, del tipo de muestra y de cómo interacciona esta con el adsorbente. En general, cuanto mayor sea el área superficial específica, mayor será el contacto con la especie a retener y por tanto mayor grado de retención⁴⁸.

1.6.1 Interacción analito-adsorbente

Se puede introducir selectividad en el proceso de extracción en fase sólida utilizando distintos adsorbente y variando la naturaleza del eluyente⁴⁹.

Las interacciones entre el sólido adsorbente y los analitos de una muestra pueden ser de tres tipos: apolares, polares e iónicas⁵⁰.

a) Interacciones apolares

Este tipo de interacción se produce entre las cadenas hidrocarbonadas del sólido adsorbente y los analitos de la muestra. Dado que la mayoría de los compuestos orgánicos posee una estructura apolar, estos pueden ser fácilmente adsorbidos mediante fuerzas de Van der Waals. La excepción la constituyen aquellos compuestos que poseen un gran número de grupos polares o iónicos, que pueden enmascarar el carácter apolar del esqueleto carbonado.

Adsorbentes típicos con un pronunciado carácter apolar son las sílices modificadas C18 y C8. Estas resinas muestran, no obstante, una baja selectividad, debido a que sus

grupos funcionales, los sustituyentes alquilo, pueden interactuar con casi todos los analitos apolares. En general, los compuestos apolares presentes en una disolución polar son fácilmente adsorbidos en adsorbentes apolares y eluidos con disolventes apolares. La C18 es, en la actualidad, la fase más ampliamente utilizada.

b) Interacciones polares

Las interacciones polares incluyen la formación de puentes de hidrógeno, interacciones dipolo - dipolo e interacciones $\pi - \pi$ que pueden ocurrir entre el sólido adsorbente y los grupos funcionales de los analitos. Algunas de esas interacciones son posibles entre grupos amino, hidroxilo y carbonilo, al igual que anillos aromáticos, dobles enlaces y grupos con heteroátomos como el nitrógeno, el azufre, el fósforo y el oxígeno.

Adsorbentes típicos de este tipo son la sílice no modificada, o las sílices modificadas con grupos -CN, -NH₂ y -OH. En general, los compuestos polares presentes en una disolución apolar son fácilmente adsorbidos en adsorbentes polares y eluidos con disolventes polares.

c) Interacciones iónicas

Las interacciones iónicas se producen entre un analito con carga positiva o negativa, y un sólido adsorbente con grupos funcionales de carga opuesta. La retención se ve favorecida si los analitos se encuentran presentes en una matriz de poca fuerza iónica, mientras que, para la elución de los analitos, lo más adecuado es utilizar un disolvente de elevada fuerza iónica. Algunos adsorbentes típicos para interacciones iónicas son las resinas Chelex-100 y Metpac CC-1.

1.6.2 Características de los sistemas SPE

Los métodos SPE presentan un gran número de ventajas frente a otras técnicas de extracción. Se trata de una técnica que utiliza una instrumentación económica, sencilla y con un consumo de disolventes relativamente bajo comparado con los habituales en los métodos LLE. Por otra parte, el SPE es rápido y proporciona elevados factores de recuperación.

Se puede automatizar el proceso e incluso acoplarlo a sistemas cromatográficos. Además, se puede usar en combinación con otros sistemas de extracción. La selectividad dependerá de la correcta selección del adsorbente y del eluyente empleados. Cabe resaltar que la extracción del analito, además de eliminar potenciales interferentes, permite preconcentrar la muestra: el volumen de muestra que se trata suele ser superior al volumen empleado en la etapa de elución.

El principal inconveniente estriba en la posibilidad de que otros componentes de la matriz afecten a la interacción del analito y el adsorbente. En otras ocasiones, compuestos oleosos y/o sólidos pueden obstruir el cartucho impidiendo la retención del analito. Ambas situaciones se traduce en una baja recuperación del analito de interés. Otro inconveniente de la técnica reside en las variaciones que se pueden dar entre lotes del mismo adsorbente, lo que se traduciría en una falta de reproducibilidad. Finalmente, indicar que esta técnica únicamente se puede aplicar a compuestos semivolátiles y no volátiles con temperaturas de ebullición muy por encima de la temperatura de trabajo, para evitar pérdidas de los analitos^{51,52}.

1.6.3 Procedimiento de extracción

La metodología para llevar a cabo la extracción consta de cuatro etapas⁵³, que se esquematizan en la figura 2 y que se resumen a continuación:

Primera etapa: Acondicionamiento del cartucho. Se emplea un disolvente adecuado para equilibrar, solvatar y limpiar el lecho.

Segunda etapa: Adición de la muestra. Se hace pasar la muestra líquida a través del cartucho donde se retienen tanto los analitos como algunas sustancias interferentes. La muestra se introduce por gravedad, presión positiva o vacío, a una velocidad de flujo controlada, que permita la completa retención de los analitos.

Tercera etapa: Etapa de lavado. Se eluyen las sustancias interferentes mediante un disolvente selectivo, mientras que los analitos permanecen en el lecho adsorbente.

Cuarta etapa: Elución de los analitos mediante un disolvente selectivo. La elución de los analitos, una vez purificados y concentrados, puede llevarse a cabo por gravedad o con ayuda de una fuente de vacío, mediante presión o por centrifugación. La velocidad del

flujo debe ser adecuada para permitir que se alcance el equilibrio y la extracción sea próxima al 100%. A veces el extracto se evapora para concentrar el analito o para redisolverlo en un disolvente compatible con la técnica analítica que se vaya a emplear a continuación.

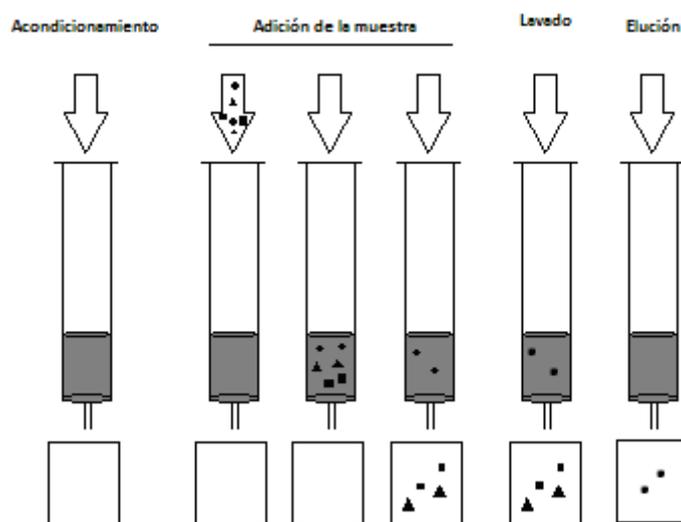


Figura 2: Proceso de SPE

La efectividad de la separación mediante SPE dependerá principalmente de la elección del sólido adsorbente y de los disolventes empleados para la elución^{54,55}. Tras considerar la naturaleza química y la polaridad de los componentes de la muestra, y del disolvente en el que se encuentran, se elige un adsorbente sólido, de actividad y tamaño de partícula adecuado, y se empaqueta la columna fabricada con un material inerte. El lecho debe ser homogéneo y estar libre de huecos y canales, para asegurar la eficiencia del contacto con la muestra.

1.6.4 Empleo de SPE en la determinación de plaguicidas

Como se ha comentado, las concentraciones de plaguicidas en las muestras medioambientales son, habitualmente, muy bajas. Esto, unido a la complejidad de este tipo de muestras, hace que, incluso cuando se emplean técnicas separativas como la cromatografía, y de elevada sensibilidad, sea necesario llevar a cabo algún pretratamiento previo de la muestra que suele implicar la extracción del plaguicida o plaguicidas de interés del resto de la matriz.

La aplicación de la SPE para llevar a cabo el proceso implica el paso de la muestra a través de un cartucho o una columna empaquetada con un adsorbente que sea capaz de retener los plaguicidas, seguido por la elución con un disolvente orgánico (generalmente los plaguicidas presentan baja polaridad), para obtener un extracto orgánico concentrado (que suele ser bastante limpio) y puede ser analizado por cromatografía de gases o cromatografía líquida, u otras técnicas analíticas suficientemente sensibles.

Los adsorbentes más usados en la extracción de plaguicidas son las alquilsílicas (C8 y C18) y, más recientemente fases poliméricas como Oasis HLB, formada por un copolímero de vinil benceno y de vinil pirrolidona⁵⁶. También son muy empleadas las tierras de diatomeas o columnas de intercambio catiónico para los compuestos iónicos. En la sección dedicada al análisis de dimetoato, se comentaron algunos de los sistemas SPE descritos en la bibliografía para su extracción.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 Objetivos

El presente Trabajo Final de Carrera tiene como objetivo principal poner a punto una estrategia basada en la extracción en fase sólida (SPE) del plaguicida dimetoato presente en muestras medioambientales de naturaleza acuosa. Dicha extracción deberá permitir la eliminación de interferentes y la preconcentración del dimetoato presente en las muestras, proporcionando la selectividad y sensibilidad necesaria para poder llevar a cabo la determinación del plaguicida. Esta se realizará mediante un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección quimioluminiscente previamente desarrollado.

Así pues, los objetivos desglosados del proyecto son los siguientes:

- Puesta a punto del sistema de SPE para la extracción del plaguicida dimetoato presente en muestras acuosas.
- Estudio de la eficacia del método de SPE desarrollado en la eliminación de interferentes.
- Aplicación del sistema de SPE a muestras de agua de diferente procedencia y determinación del dimetoato mediante un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección por quimioluminiscencia (CL) previamente desarrollado.

2.2 Plan de trabajo

A continuación se detalla el plan de trabajo que se ha seguido en la realización del Trabajo Final de Carrera:

1. Revisión bibliográfica, con la finalidad de obtener información sobre los sistemas de SPE previamente empleados con el plaguicida dimetoato.
2. Estudio del efecto de diferentes disolventes orgánicos en el sistema FIA-CL.

Los disolventes orgánicos, habitualmente empleados como eluyente en los sistemas SPE, a menudo afectan a la respuesta quimioluminiscente, especialmente cuando esta se basa en el empleo oxidantes fuertes. Para determinar si este es el caso del sistema FIA-CL seleccionado para llevar a cabo la determinación del dimetoato, se

estudiará el efecto de los disolventes orgánicos más habituales, tales como metanol, acetonitrilo, etanol o acetona. En caso de que los disolventes orgánicos no fueran compatibles con el sistema de detección, sería necesario llevar a cabo tediosos procesos de eliminación del mismo y redisolución del plaguicida en un medio adecuado.

3. Estudio comparativo de diversos sistemas de SPE.

Para seleccionar el adsorbente más adecuado para llevar a cabo la extracción del dimetoato, se ensayarán diversos cartuchos de adsorbentes comerciales y se determinará el factor de recuperación proporcionado por cada uno de ellos.

4. Puesta a punto del sistema de SPE.

Una vez seleccionado el adsorbente más adecuado, en función de los resultados del punto anterior, se estudiarán las variables más importantes que pueden afectar a la recuperación del dimetoato, tales como volumen de elución y caudal al que se pasa la muestra en la etapa de carga o al que se realiza la elución. En caso de que fuera necesario eliminar el disolvente empleado en la elución, se estudiarían las condiciones más adecuadas para ello.

5. Estudio de interferentes en el sistema SPE-FIA-CL.

Se estudiará la capacidad de la estrategia de SPE desarrollada para eliminar las especies que interfieren en la determinación del dimetoato mediante el sistema FIA-CL.

6. Aplicación del sistema de SPE-FIA-CL a la determinación de dimetoato en muestras de agua.

El método desarrollado se aplicará a la determinación del plaguicida dimetoato en diversas muestras de agua natural de diferente procedencia, con el fin de comprobar la aplicabilidad de la estrategia desarrollada.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Todas las disoluciones empleadas en la realización de este Trabajo Final de Carrera se realizaron con agua desionizada mediante un equipo MilliQ (Millipore, Bedford, MA, USA) provisto de un filtro de 0.22 μm .

En la tabla 1 se indican los reactivos utilizados junto con la casa comercial que los suministró.

Compuesto	Casa comercial
NaOH	Panreac
Dimetoato (99,4%)	Fluka
Acetonitrilo	J.T. Baker
Etanol	Scharlau
Acetona	Panreac
Metanol	Scharlau
HCl	Scharlau
$\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$	Fluka
Cloruro de headecilpiridinio (CHP)	Sigma
Na_2SO_4	Scharlau
NaCl	Scharlau
KIO_4	Scharlau
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Panreac
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Scharlau
NH_4SCN	Panreac
H_2SO_4	Panreac
CH_3COONa	Sigma-Aldrich
H_3PO_4	JT Baker
NaHCO_3	Panreac
NaNO_2	Panreac
NaNO_3	Panreac
Urea	Scharlau
Clorpirifos (99,9%)	Sigma Aldrich

Tabla 1: Reactivos utilizados y casa comercial.

3.2 Cartuchos de SPE

En la tabla 2 se detalla la información referente a los cartuchos comerciales ensayados en el presente Trabajo Final de Carrera.

Cartucho	Casa comercial
BOND ELUT-ENV 3ml/200mg	Varian
CHROMABOND (resina adsorbente de poliestireno-divinilbenceno) 6ml/500mg	Macherey-Nagel
BOND ELUT C18 3ml/200 mg	Varian

Tabla 2: Cartuchos utilizados y casa comercial.

3.3 Aparatos

3.3.1 Instrumental del trabajo experimental

Los equipos utilizados a lo largo del estudio se indican a continuación:

- Balanza analítica PI214 de la serie Pinchale de Denver Instruments
- Bomba de vacío Supelco
- Bomba de vacío PSelecta.

3.3.2 Elementos del sistema FIA-CL

Los equipos que conformaron el sistema FIA-CL empleado para la detección del dimetoato fueron los siguientes:

- Válvula de inyección de seis puertos de presión media (Upchurch scientific, Modelo V450)
- Bomba peristáltica (Wilson, Modelo Miniplus 3)
- Tubos de PVC-Standard (Restec)

- Tubo de teflón de 0,8 mm de diámetro interno (Omnifit)
- Confluencias en forma de Y y de T, tuercas y roscas (Omnifit)
- Luminómetro: de fabricación propia. Consta de:
 - Celda: Inmediatamente antes de esta, se mezclan los reactivos y la muestra en una confluencia en forma de T. La celda está situada frente a la ventana del tubo fotomultiplicador y consta de un tubo de vidrio de 1 mm de diámetro interno, enrollado con un diámetro total de 3 cm.
 - Tubo fotomultiplicador: es el P30CWAD5F tipo 9125B de Electron Tubes, operando a 180 V. Está conectado al ordenador que recibe la señal procesándola con el programa suministrado por la misma casa comercial.

3.4 Determinación del dimetoato: sistema FIA-CL

El método de detección del plaguicida empleado en el presente Trabajo Final de Carrera, fue desarrollado previamente en los laboratorios de química de la Escuela Politécnica Superior de Gandía. Dicho método se basó en la combinación de la metodología de Análisis por Inyección en Flujo con la detección por quimioluminiscencia (FIA-CL) del dimetoato.

El esquema del montaje FIA desarrollado, así como todos los parámetros tanto físicos como químicos implicados, se resumen en la figura 3.

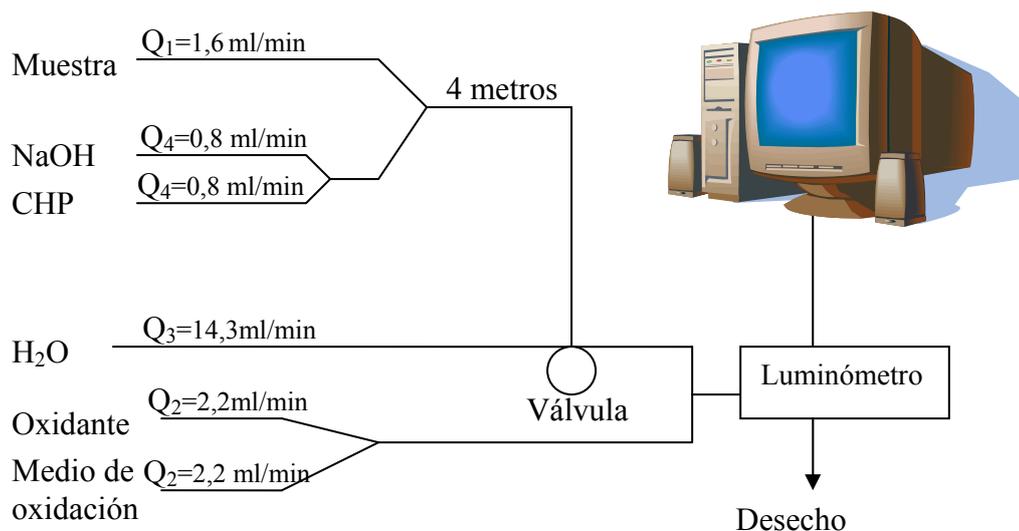


Figura 3: Sistema FIA. Oxidante: $Ce(IV)$ $1,8 \cdot 10^{-3}$ M, medio de oxidación HCL 2,2 M, NaOH 0,34 M, CHP (cloruro de hexadecil piridinio) 0,4%. Volumen de inserción: 659 μ l.

Como se esquematiza en la figura 3, la muestra de dimetoato se introdujo en el sistema circulando a un caudal de 1,6 ml/min. Por un segundo canal se introdujo hidróxido sódico 0,34 M que dio lugar a la hidrólisis alcalina del plaguicida, y por un tercer canal circuló una disolución de 0,4% de cloruro de hexadecil piridinio que actuó como sensibilizador de la reacción quimioluminiscente. Ambos reactivos circularon a un caudal de 0,8 ml/min, confluyendo con la muestra y recorriendo un reactor de 4 m antes de llenar un bucle de 659 μ l de la válvula de inserción. Dicho volumen fue insertado en un portador de agua a 14,3 ml/min, para confluir con el sistema oxidante inmediatamente antes de alcanzar la celda de detección. El sistema oxidante estuvo formado por una mezcla, realizada *in situ*, de $Ce(IV)$ $1,8 \cdot 10^{-3}$ M y HCL 2,2 M, ambos circulando a 2,2 ml/min. Una vez el producto de la reacción de oxidación alcanzó la celda de detección se registró la luz emitida como consecuencia de la misma mediante un tubo fotomultiplicador, generándose el fiagrama.

El sistema FIA-CL desarrollado presentó dos intervalos de linealidad, entre 0,5 y 100 μ g/l el primero y entre 100 y 800 μ g/l el segundo. La reproducibilidad entre días del sistema FIA propuesto, se determinó a partir de la Desviación Estándar Relativa (DSR) de las pendientes de cinco rectas de calibrado, y tuvo un valor de 4,5 y 4,6%, para el primer y segundo intervalo lineal respectivamente.

El límite de detección del método se determinó experimentalmente, estableciéndose como la mínima concentración de dimetoato que dio una señal igual a la del blanco más

tres veces la desviación estándar absoluta del mismo. La concentración así establecida como límite de detección fue de 0,05 $\mu\text{g/l}$.

La repetitividad del método propuesto se determinó a partir de dos series de 21 inserciones de dimetoato de 10 $\mu\text{g/l}$ y de 400 $\mu\text{g/l}$. Las desviaciones estándar relativa obtenidas para cada serie fueron de 2,8 y de 1,5% respectivamente. La frecuencia o velocidad de inserción se determinó a partir de esta misma serie de picos, quedando establecida en 86 h^{-1} .

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1 Efecto de los disolventes orgánicos en el sistema FIA-CL

El sistema FIA-CL seleccionado para la llevar a cabo la determinación del dimetoato, y que ha sido descrito en la sección 3.4, se basó en la reacción de un oxidante fuerte, cerio (IV) en medio ácido clorhídrico, con el producto de la hidrólisis alcalina del dimetoato, actuando el cloruro de hexadecil piridinio como sensibilizador de la reacción quimioluminiscente.

Con frecuencia los disolventes orgánicos afectan a la señal quimioluminiscente en este tipo de sistemas, pudiendo provocar una inhibición o una exaltación de la misma, y por tanto una interferencia en la determinación. Así pues, en caso de emplearse un disolvente orgánico para la elución del plaguicida en el proceso de SPE, serían necesarios tediosos procesos para la eliminación del mismo por evaporación y la posterior redisolución del residuo sólido obtenido en un medio compatible con el sistema FIA-CL.

Con el fin de determinar el efecto de algunos de los disolventes orgánicos habitualmente empleados en los procesos de SPE sobre el sistema FIA-CL, se prepararon calibrados del plaguicida en presencia de: metanol, etanol, acetonitrilo y acetona. Se consideraron dos porcentajes distintos de cada disolvente orgánico, 10 y 20%, y además se preparó un calibrado de dimetoato en agua para emplearlo como referencia. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la tabla 4 y los gráficos 1, 2 y 3, siendo las concentraciones de dimetoato utilizadas: 0, 1, 5, 15, 35 y 70 $\mu\text{g/l}$. En el caso de la acetona, las señales de blanco obtenidas fueron tan elevadas que su uso fue descartado, por lo que no se ha reflejado en las tablas y gráficos.

[Dimetoato], $\mu\text{g/l}$	Referencia	ACN 10%	ACN 20%	Etanol 10%	Etanol 20%	Metanol 10%	Metanol 20%
0	1610	2090	3150	3040	3890	6900	6300
1	2110	2470	3160	3120	3700	7900	6600
5	3650	4060	5090	4500	4970	8800	7300
15	7480	8080	9220	7690	8070	10100	8400
35	15700	16800	18400	14800	13200	12840	11500
70	30500	33100	34400	25400	21360	18500	14540

Tabla 4: Señales (Hz) obtenidas para diferentes concentraciones de dimetoato en diferentes medios.

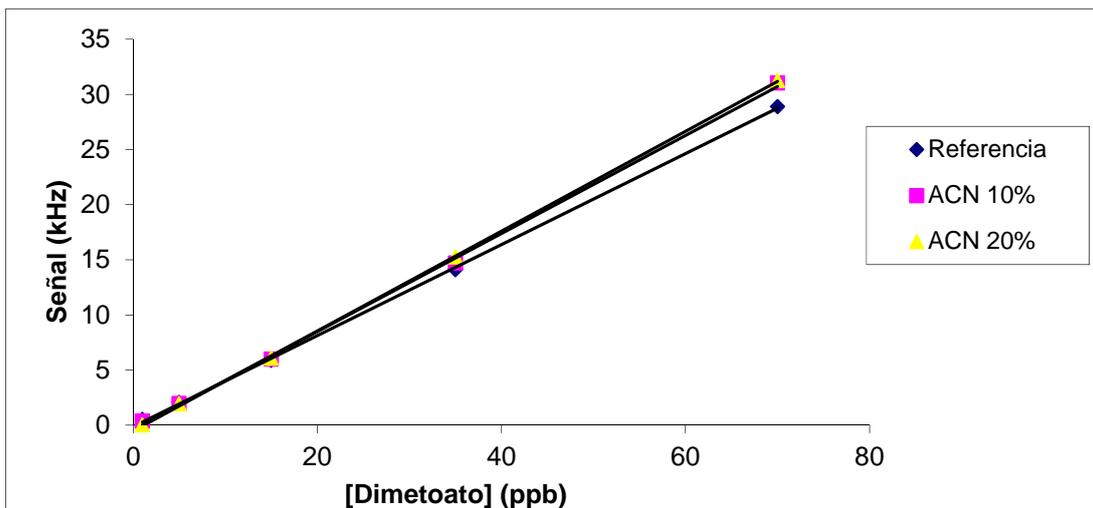


Gráfico 1: Efecto del acetonitrilo en el sistema FIA-CL. I es la intensidad de la señal corregida restando el blanco.

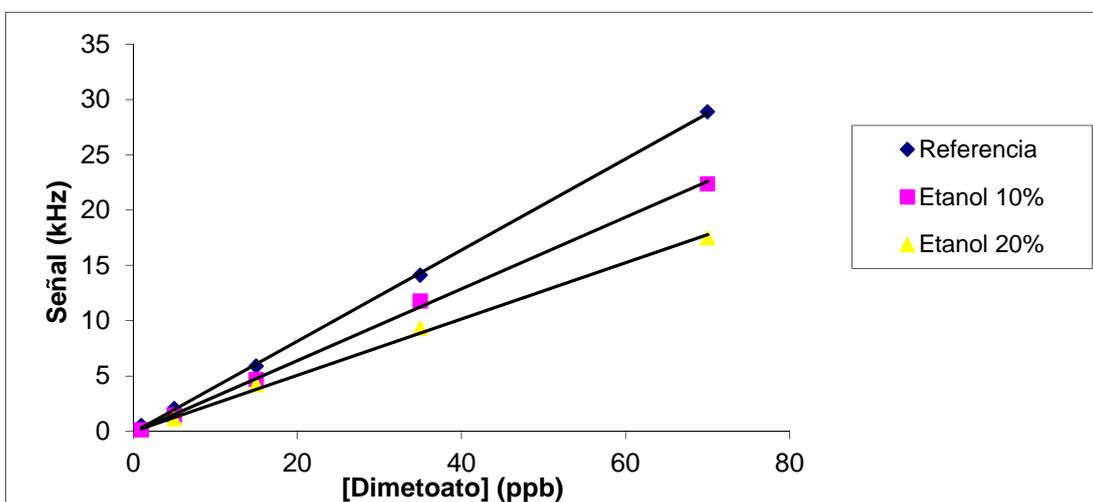


Gráfico 2: Efecto del etanol en el sistema FIA-CL. I es la intensidad de la señal corregida restando el blanco.

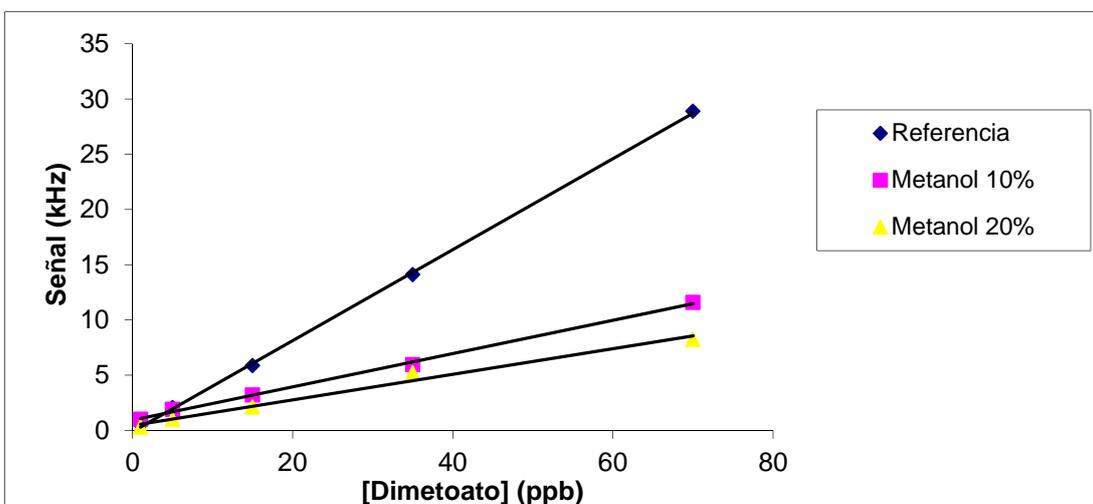


Gráfico 3: Efecto del metanol en el sistema FIA-CL. I es la intensidad de la señal corregida restando el blanco.

Como se observa en los resultados mostrados en los gráficos anteriores, la presencia de metanol (gráfico 3) y etanol (gráficos 2) supuso un descenso importante en las señales obtenidas, una vez corregidas por el blanco. Las señales obtenidas para las concentraciones más bajas de dimetoato ensayadas fueron difícilmente detectables y la pendiente de la recta de calibrado sufrió un importante descenso, especialmente acentuado en el caso del metanol. En la tabla 5 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas, así como la variación experimentada por la pendiente de la recta tomando como referencia el calibrado preparado en agua.

Sin embargo, en el caso del acetonitrilo el efecto diferió considerablemente de los anteriores disolventes. Como se observa en el gráfico 1 y la tabla 5, la pendiente de la recta incluso se incrementó ligeramente respecto de la obtenida en agua, en concreto un 8,0 y un 9,7% para acetonitrilo al 10 y 20% respectivamente.

Aunque el incremento de la pendiente fue algo superior al aumentar el porcentaje de acetonitrilo, se descartó ensayar concentraciones más altas por diversos motivos. Por una parte se observó un aumento de la señal de blanco, lo que habitualmente se traduce en un incremento en el límite de detección. Por otra parte, se deseaba minimizar en la medida de lo posible el empleo de disolventes orgánicos, para desarrollar un método lo más limpio posible.

Medio	Ecuación de la recta de calibrado	Δ pendiente, %
Agua (referencia)	$I = 0.412 \cdot C - 0.108; r^2 = 0.9997$	-
Acetonitrilo 10%	$I = 0.445 \cdot C - 0.394; r^2 = 0.9992$	+8.0%
Acetonitrilo 20%	$I = 0.452 \cdot C - 0.497; r^2 = 0.9999$	+9.7%
Etanol 10%:	$I = 0.324 \cdot C - 0.111; r^2 = 0.9989$	-21,4%
Etanol 20%:	$I = 0.254 \cdot C + 0.039; r^2 = 0.9969$	-38.3%
Metanol 10%	$I = 0.151 \cdot C + 0.928; r^2 = 0.9981$	-63.3%
Metanol 20%:	$I = 0.116 \cdot C + 0.445; r^2 = 0.98$	-71.8%

Tabla 5: Donde I representa la señal corregida por el blanco, medida en kHz, y C la concentración, en $\mu\text{g/l}$.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se deduce que la presencia de pequeños porcentajes de acetonitrilo (en torno al 10%) no suponen una alteración significativa en la respuesta del sistema FIA-CL, de manera que el empleo de este disolvente como eluyente en el proceso de SPE sería perfectamente compatible con el mismo.

4.2 Selección del sistema del adsorbente para la SPE

Como resultado de la búsqueda bibliográfica realizada, se encontró que existe una gran variedad de sistemas de SPE que han sido empleados para extraer dimetoato de muestras acuosas, que incluyen tanto cartuchos con rellenos apolares tipo C18 y C8 y de diferentes polímeros.

En el presente estudio se incluyeron tres cartuchos comerciales diferentes, que fueron:

- Cartuchos BOND ELUT-ENV con 200 mg de relleno, comercializados por la casa Varian para la extracción de plaguicidas. La composición del adsorbente no es facilitada por la casa.
- Cartuchos CHROMABOND con 500 mg de una resina adsorbente de poliestireno-divinilbenceno, comercializado por la casa Macherey-Nagel.
- Cartuchos BOND ELUT-ENV de C18 con 200 mg de relleno, comercializados por la casa Varian.

En todos los casos, el procedimiento seguido para llevar a cabo la SPE fue el mismo y se resume a continuación:

Primera etapa: Acondicionamiento del cartucho.

Se pasaron a través del cartucho 3 ml de metanol, 3 ml de acetonitrilo y de nuevo 3 ml de metanol. Finalmente se pasaron 9 ml de agua para eliminar los restos de disolvente orgánico.

Segunda etapa: Adición de la muestra.

Se pasó a través de los cartuchos acondicionados 50 ml de 6 disoluciones patrón de dimetoato en agua, de concentraciones comprendidas entre 0,1 y 12 $\mu\text{g/l}$, además de una disolución blanco (0 $\mu\text{g/l}$ de dimetoato). El caudal al que pasó cada disolución a través del cartucho se mantuvo entre 2-3 ml/min.

Tercera etapa: Etapa de lavado.

A continuación se procedió al lavado del cartucho empleando 9 ml de agua y finalmente se secó el cartucho dejando pasar aire a su través durante 20 minutos con ayuda de la bomba de vacío.

Cuarta etapa: Elución.

Finalmente se empleó 1 ml de acetonitrilo para eluir el dimetoato retenido en el cartucho. La elución se realizó por gravedad y cuando ya no se observó líquido se aplicó vacío para recoger el máximo disolvente. Finalmente se pasaron a través del cartucho 2 ml de agua, para arrastrar cualquier resto de acetonitrilo que pudiera haber quedado retenido en el sistema y se completó hasta un volumen de 10 ml con agua en un matraz aforado.

Teniendo en cuenta que el volumen final tras la elución fue de 10 ml y el volumen tratado de cada patrón fue de 50 ml, las concentraciones obtenidas después del proceso de SPE deberían ser 5 veces superiores a las de partida, situándose entre 0,5 y 60 µg/l, dentro por tanto del intervalo de linealidad del método FIA-CL. Además, cada una de las disoluciones de dimetoato obtenidas contenía un 10% de acetonitrilo.

Para comprobar la efectividad de cada cartucho en las condiciones ensayadas, las disoluciones obtenidas se insertaron en el sistema FIA-CL, junto con un calibrado de dimetoato preparado en acetonitrilo al 10%. En las tablas 6, 7 y 8 se muestran la concentración de dimetoato encontrada tras aplicar la estrategia SPE-FIA-CL con cada uno de los cartuchos ensayados, así como los porcentajes de recuperación obtenidos en cada caso.

[Dimetoato]_{preparada}, µg/l	[Dimetoato]_{encontrada}, µg/l	Recuperación, %
0,5	1,925	385
1,5	4,625	308
5	16,196	324
15	36,884	246
30	66,338	221
60	113,324	189

Tabla 6: Resultados obtenidos al aplicar la estrategia SPE-FIA-CL con los cartuchos BOND ELUT-ENV.

Como se observa en la tabla 6 las concentraciones encontradas para el cartucho de BOND ELUT-ENV fueron significativamente superiores a las reales, con factores de recuperación situados entre 189 y 385%. Esto probablemente pueda deberse al desprendimiento de algún compuesto del relleno del cartucho por efecto del acetonitrilo, ya que la señal del blanco obtenida también fue unas 2.5 veces mayor a la

proporcionada por un blanco con el mismo porcentaje de acetonitrilo pero que no pasó a través del catucho.

[Dimetoato]_{preparada}, µg/l	[Dimetoato]_{encontrada}, µg/l	Recuperación, %
0,5	-	-
1,5	-	-
5	-	-
15	0,783	5,2
30	5,750	19,2
60	17,596	29,3

Tabla 7: Resultados obtenidos al aplicar la estrategia SPE-FIA-CL con los cartuchos CHROMABOND.

Como se muestra en la tabla 7, el empleo de los cartuchos de Chromabond, rellenos de una resina adsorbente de poliestireno-divinilbenceno, proporcionó factores de recuperación muy bajos. De hecho, las concentraciones de dimetoato más bajas fueron indistinguibles de la señal de blanco. Los motivos pueden ser varios, ya que es posible que el plaguicida no sea retenido en el cartucho o bien que este no sea completamente eluido con 1 ml de acetonitrilo.

[Dimetoato]_{preparada}, µg/l	[Dimetoato]_{encontrada}, µg/l	Recuperación, %
0,5	0,507	101,4
1,5	1,648	109,9
5	4,311	86,2
15	15,014	100,1
30	29,815	99,4
60	68,593	114,3

Tabla 8: Resultados obtenidos al aplicar la estrategia SPE-FIA-CL con los cartuchos C18.

Según los datos obtenidos, mostrados en la tabla 8, podemos observar que los resultados con el relleno de C18 fueron satisfactorios en todo el intervalo de concentraciones ensayado, siendo la recuperación promedio obtenida del $(102 \pm 10)\%$.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió seleccionar los cartuchos de C18 para llevar a cabo la etapa de SPE. Se mantuvo en todas las experiencias el volumen de muestra en 50 ml, de modo que el factor de preconcentración fue de 5. Tratando

volúmenes mayores sería posible incrementar aun más la sensibilidad del método, aunque a costa de incrementar el tiempo de análisis.

4.3 Optimización de variables del SPE

Una vez seleccionado el adsorbente y eluyente a emplear, una de las variables más importantes que pueden afectar al proceso de SPE es el caudal al que la muestra atraviesa el cartucho, ya que este debe ser tal que permita la interacción efectiva del analito con el adsorbente. Otras variables igualmente importantes son el volumen de eluyente y el caudal al que este atraviesa el cartucho, que debe permitir la desorción completa del analito.

El volumen empleado de eluyente en las experiencias anteriores fue de 1 ml, valor de por sí lo suficientemente bajo, teniendo en cuenta el volumen del cartucho, como para evitar el estudio de valores inferiores. Por otra parte, se descartó el empleo de volúmenes mayores para no incrementar el consumo de acetonitrilo, disolvente de elevada toxicidad.

La elución se llevó a cabo por gravedad para asegurar que el tiempo de contacto fuera suficiente, y dado el pequeño volumen de disolvente empleado, se consideró innecesario estudiar el empleo de caudales mayores que no habrían repercutido en una mejora significativa en la velocidad del proceso.

Así pues, la única variable que fue necesario estudiar fue el efecto del caudal o velocidad a la que la muestra atraviesa el cartucho. Para ello se repitió la experiencia anterior pero modificando la etapa 2, para emplear un caudal mayor que permitiera reducir el tiempo necesario para procesar las muestras. En este caso el caudal se mantuvo entre 5-6 ml/min, mostrándose en la tabla 9 los resultados obtenidos.

[Dimetoato]_{preparada}, µg/l	[Dimetoato]_{encontrada}, µg/l	Recuperación, %
0,5	0,303	60,6
1,5	1,246	83,1
5	3,871	77,4
15	16,029	106,9
30	19,954	66,5
60	51,560	85,9

Tabla 9: Resultados obtenidos con los cartuchos C18 usando 5-6 ml/min como caudal de la muestra.

La recuperación promedio obtenida en esta experiencia fue de $(80\pm 16)\%$, valor muy inferior al obtenido en la experiencia anterior, para un caudal de muestra entre 2-3 ml/min (tabla 8), probablemente debido a que el tiempo de interacción muestra-adsorbente no fue suficiente para una efectiva retención del dimetoato. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió mantener el caudal de la muestra en un valor en torno a 2,5 ml/min.

4.4 Estudio de interferentes

Como se ha comentado anteriormente, el principal objetivo del presente Trabajo Final de Carrera fue el desarrollo de una estrategia que permitiera incrementar la selectividad del sistema FIA-CL propuesto en un trabajo anterior para la determinación del dimetoato en muestras de agua de diversa procedencia. En dicho trabajo, se realizó un estudio del efecto sobre la señal de algunos de los iones mayoritarios presentes en las aguas naturales encontrándose que algunos de ellos podrían suponer una seria interferencia en el método propuesto. En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en dicho estudio, en el que también se incluyó la urea y el plaguicida clorpirifos, ya que este a menudo acompaña al dimetoato en las formulaciones comerciales. Para llevar a cabo la experiencia se preparó una disolución de 10 $\mu\text{g/l}$ de dimetoato como referencia y se comparó su señal con la proporcionada por una disolución de igual concentración en presencia de la especie cuya potencial interferencia se estaba estudiando. La concentración de interferente se fue disminuyendo hasta obtener un error relativo respecto a la señal de referencia inferior al 5%.

Interferente	Concentración, mg/l	Er (%)
Na ⁺	1000*	-1,2
Cl ⁻	1540*	-1,2
K ⁺	1000*	-3,4
Ca ²⁺	600	-2,9
Mg ²⁺	10	+4,5
NH ₄ ⁺	100*	-2,6
SO ₄ ²⁻	1000*	-5,0
CH ₃ COO ⁻	100*	+0,9
H ₂ PO ₄ ⁻	10	+4,9
HCO ₃ ⁻	500*	+1,3
NO ₂ ⁻	1,5	+2,6
NO ₃ ⁻	100*	-4,3
Urea	15	+4,6
Clorpirifos	0,0035	+2,8

*Concentración máxima ensayada

Tabla 10: Estudio de interferentes en la determinación de dimetoato por FIA-CL.

El catión magnesio, el ion fosfato y la urea, fueron los principales interferentes del método FIA-CL, ya que estos se pueden encontrar en las muestras de agua en concentraciones superiores a las máximas toleradas por el mismo. El ion nitrito reacciona con el oxidante y por ello también afectó a la señal quimioluminiscente. Sin embargo, habitualmente se encuentra en concentraciones muy bajas en las aguas dada su inestabilidad.

Por otra parte, el clorpirifos también supuso una seria interferencia en el método, especialmente si se tiene en cuenta que las formulaciones comerciales contienen un 27,8%_{p/v} clorpirifos junto con un 22,2%_{p/v} dimetoato⁵⁷.

Para comprobar si el proceso desarrollado basado en la SPE empleando cartuchos de C18 permitía eliminar estas especies interferentes, incrementando así la selectividad del método final SPE-FIA-QL, se prepararon disoluciones de dimetoato de 2 µg/l en presencia de las concentraciones mostradas en la tabla 11 de las especies que se habían

detectado como potenciales interferentes en la experiencia anterior. Tras el proceso de SPE la concentración del dimetoato sería de 10 µg/l, la misma concentración empleada en el estudio anterior. Una disolución de igual concentración de plaguicida en agua se trató del mismo modo para emplearla como referencia.

Interferente	Concentración, mg/l	Er (%)
Ca ²⁺	1000	+2.5
Mg ²⁺	200	+3.8
H ₂ PO ₄ ⁻	500	+4.9
Urea	200	+4.8
Clorpirifos	2.5 µg/l	-1.4

Tabla 11: Estudio de interferentes en la determinación de dimetoato por SPE-FIA-CL.

Para todas las especies estudiadas, el error relativo obtenido al aplicar la estrategia SPE-FIA-CL fue inferior al 5%, por lo que se puede decir que el sistema de extracción permitió eliminar eficazmente las especies interferentes, incrementando de este modo la selectividad del método analítico.

4.5 Resumen del sistema optimizado de extracción en fase sólida

El procedimiento de SPE seleccionado para llevar a cabo la limpieza y preconcentración del plaguicida dimetoato presente en muestras de agua se resume a continuación:

Primera etapa: Acondicionamiento del cartucho

El cartucho seleccionado contuvo un relleno de C18 (200 mg). A su través se pasaron 3 ml de metanol, 3 ml de acetonitrilo y de nuevo 3 mL de metanol para acondicionarlo. Finalmente se pasaron 9 ml de agua para eliminar los restos de disolvente orgánico.

Segunda etapa: Adición de la muestra

Un volumen de 50 ml de la muestra acuosa conteniendo dimetoato se pasa a través del cartucho previamente acondicionado a un caudal entre 2-3 ml/min.

Tercera etapa: Etapa de lavado

A continuación se procede al lavado del cartucho empleando 9 ml de agua y finalmente se seca el mismo dejando pasar aire a su través durante 20 minutos con ayuda de una bomba de vacío.

Cuarta etapa: Elución

Finalmente se emplea 1 ml de acetonitrilo para eluir el dimetoato retenido en el cartucho. La elución se realiza inicialmente por gravedad y cuando ya no se observa líquido se aplica vacío para recoger el máximo disolvente. Finalmente se pasan a través del cartucho 2 ml de agua, para arrastrar cualquier resto de acetonitrilo que pudiera haber quedado retenido en el sistema y se completa hasta el aforado de 10 ml con agua.

Para determinar la concentración de dimetoato en cada muestra, se compara la señal con la obtenida en el sistema FIA-CL descrito en la sección 2.4 empleando un calibrado de dimetoato en presencia de un 10% de acetonitrilo.

5. MUESTRAS REALES

Para comprobar la eficacia de la estrategia SPE-FIA-CL propuesta, se procedió a aplicarla a muestras de agua naturales de diferencia procedencia.

En la tabla 12 se muestra la procedencia de cada una de ellas. Las muestras se recogieron en una botella de plástico y se mantuvieron a 4°C para ser analizadas en menos de 48 horas. Con el fin de eliminar arena y otros sólidos en suspensión, a su llegada al laboratorio fueron filtradas empleando un filtro de membrana de 0,45 µm.

Tipo de agua	Localidad
Mar	Playa de Gandía
Fuente	Balconchán, Zaragoza
Pozo	Huesca
Grifo	Grau de Gandía
Mineral Bezoya	Ortigosa del Monte (Segovia)

Tabla 12: Procedencia de las muestras de agua estudiadas.

Se tomaron alícuotas de 50 ml de cada muestra y se doparon con el volumen necesario de una disolución patrón de 100 mg/l de dimetoato para obtener concentraciones de plaguicida de 0,2, 0,5 y 1,0 µg/l. Se prepararon tres réplicas de cada concentración. Se trataron a continuación tal y como se ha descrito en el apartado anterior para llevar a cabo la SPE, de modo que las concentraciones de dimetoato obtenidas tras la elución fueran: 1,0, 2,5 y 5,0 µg/l. Finalmente se determinó la concentración de dimetoato mediante el sistema FIA-CL. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en las tablas de la 13 a la 17.

[Dimetoato] adicionada, µg/l	[Dimetoato] encontrada, µg/l	Recuperación, %	Error relativo, %
1,0	0,391	39,1	(60±30)
	0,866	86,6	
	-	-	
2,5	2,634	108,5	(107±2)
	2,713	105,3	
	-	-	
5,0	4,269	85,4	(110±30)
	6,486	129,7	
	-	-	

Tabla 13: Determinación de dimetoato (SPE-FIA-CL) en una muestra de agua de mar

La recuperación promedio en la determinación de dimetoato en la muestra de agua de mar fue del (90±30)%. En los tres casos una de las réplicas se perdió por errores aleatorios.

[Dimetoato] adicionada, µg/l	[Dimetoato] encontrada, µg/l	Recuperación, %	Error relativo, %
1,0	0,921	92,1	(93±14)%
	1,072	107,2	
	0,791	79,1	
2,5	2,434	97,4	(97±7)%
	2,586	103,4	
	2,233	89,3	
5,0	5,517	110,3	(108±2)%
	5,423	108,5	
	5,298	106,0	

Tabla 14: Determinación de dimetoato (SPE-FIA-CL) en una muestra de agua de fuente

La recuperación promedio en la determinación de dimetoato en la muestra de agua procedente de fuente fue del (99±11)%.

[Dimetoato] adicionada, $\mu\text{g/l}$	[Dimetoato] encontrada, $\mu\text{g/l}$	Recuperación, %	Error relativo, %
1,0	0,990	99,0	(96 \pm 5)%
	0,990	99,0	
	0,909	90,9	
2,5	2,449	98,0	(110 \pm 11)%
	2,930	117,2	
	2,877	115,1	
5,0	5,696	113,9	(113 \pm 3)%
	5,797	115,9	
	5,520	110,4	

Tabla 15: Determinación de dimetoato (SPE-FIA-CL) en una muestra de agua de pozo

La recuperación promedio en la determinación de dimetoato en la muestra de agua de pozo fue del (107 \pm 10)%.

[Dimetoato] adicionada, $\mu\text{g/l}$	[Dimetoato] encontrada, $\mu\text{g/l}$	Recuperación, %	Error relativo, %
1,0	1,014	101,4	(103 \pm 9)%
	1,120	112,0	
	0,946	94,6	
2,5	2,569	102,8	(93 \pm 9)%
	2,126	85,0	
	2,253	90,1	
5,0	4,798	96,0	(90 \pm 6)%
	4,225	84,5	
	4,509	90,2	

Tabla 16: Determinación de dimetoato (SPE-FIA-CL) en una muestra de agua de grifo

La recuperación promedio en la determinación de dimetoato en la muestra de agua de grifo fue del (95 \pm 9)%

[Dimetoato] adicionada, $\mu\text{g/l}$	[Dimetoato] encontrada, $\mu\text{g/l}$	Recuperación, %	Error relativo, %
1	1,000	100,0	(100 \pm 8)%
	0,924	92,4	
	1,076	107,6	
2.5	2,368	94,7	(96 \pm 5)%
	2,520	100,8	
	2,292	91,7	
5	5,067	101,3	(98 \pm 3)%
	4,801	96,0	
	4,839	96,8	

Tabla 17: Determinación de dimetoato (SPE-FIA-CL) en una muestra de agua mineral

La recuperación promedio en la determinación de dimetoato en la muestra de agua mineral comercial fue del (98 \pm 5)%.

En resumen, los resultados obtenidos muestran recuperaciones promedio entre el 90 y 107% empleando concentraciones entre 0,2 y 1,0 $\mu\text{g/l}$ de dimetoato y cinco matrices acuosas de diferente procedencia.

6. CONCLUSIONES

El sistema de extracción en fase sólida (SPE) desarrollado ha permitido una eficaz limpieza y preconcentración del dimetoato presente en muestras de agua de diferente naturaleza.

Las concentraciones en las que se encuentran los plaguicidas en las muestras de aguas naturales son muy bajas, lo que hace necesario el desarrollo de métodos analíticos con una elevada sensibilidad. Aunque la estrategia FIA-CL previamente desarrollada fue altamente sensible, permitiendo la determinación de dimetoato en concentraciones del orden de partes por billón, la Unión Europea ha establecido un valor máximo en muestras de consumo humano de 0,1 $\mu\text{g/l}$ para plaguicidas individuales y de 0,5 $\mu\text{g/l}$ para plaguicidas totales⁵⁸. Es por ello que la preconcentración mediante técnicas de extracción es necesaria. La estrategia de SPE desarrollada ha permitido la determinación eficaz de concentraciones de dimetoato entre 0,2 y 1,0 $\mu\text{g/l}$, tratando 50 ml de muestra de agua. Incrementando el volumen de muestra, fácilmente se podría llegar a determinar las concentraciones máximas fijadas por la legislación para muestras de agua de consumo humano.

Por otra parte, un problema habitual en la mayoría de los métodos analíticos es la falta de selectividad, ya que las muestras medioambientales presentan una elevada complejidad. La estrategia de SPE desarrollada ha demostrado su eficacia al eliminar aquellos iones, además de la urea y el clorpirifos (plaguicida formulado junto con el dimetoato), que fueron causa de interferencia en el método FIA-CL.

Así pues, los objetivos planteados en el Trabajo Final de Carrera han sido alcanzados con éxito, habiéndose desarrollado una estrategia SPE-FIA-QL que podría resultar de interés en el control de los niveles de dimetoato en muestras de agua de diferente procedencia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.J. Navas, A.M. Jiménez
“Review of chemiluminescent methods in food analysis”
Food chemistry 1996, 55(1), 7-15.
- [2] K. Mervartova, M. Polasek, J. Martínez Calatayud.
“Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals”
J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, 45, 367-381.
- [3] M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud.
“Enhanced flow injection-chemiluminometric determination of sulphonamides by on-line photochemical reaction”
Anal. Chim. Acta, 2003, 449, 57-69.
- [4] M. Ciborowski, M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud.
“FI-chemiluminometric study of thiazides by on-line photochemical reaction.”
J. Pharmac. Biomed. Anal., 2004, 36, 693-700.
- [5] M. Catalá Icardo, J. Martínez Calatayud.
“Photo-Induced Luminiscence”
Crit. Rev. Anal. Chem. 2008, 38, 118-130.
- [6] L. Gamiz Gracia, A.M. García Campana, J.J. Soto Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, A. González Casado.
“Analysis of pesticides by chemiluminescence detection in the liquid phase”.
Trends Anal. Chem. 2005, 24(11), 927-942.
- [7] Z. Pawlicová, I. Sahuquillo, M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud.
“Chemiluminescent determination of the pesticide bromoxyl by on-line photodegradation in a flow-injection assembly”.
Analytical Science, 2006, 22(1), 29-34.

[8] J.L. López Paz, M. Catalá Icardo.

“Flow injection-photoinduced-chemiluminescence determination of ziram and zineb”.

Anal. Chim. Acta, 2008, 625(2), 173-179.

[9] M. Ruiz Torres, A. Montel Bueno.

“Efectos del dimetoato usado en aplicaciones terrestres y aéreas sobre la entomofauna de olivar en la provincia de Jaén”

Bol. San. Veg. Plagas, 2002, 28, 525-560.

[10] O.M. Milla Cotos, W.R. Palomino Horna.

“Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetil colinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas”

Tesis doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima (Perú), 2002.

[11] D. Hawkins, D. Kirkpatrick, C. Till.

“The Hydrolysis of [Carbon-14]-Dimethoate: Report No. HRC/DTF 6A/86268.”

Un-published study prepared by Huntingdon Research Centre, Ltd. 40 p. 1986.

[12] A.S. Petsas, M.C. Vagi, M.N. Kostopoulou, M.D. Pavlaki, N.M. Smaragdaki and T.D. Lekkas.

“Accurate toxicity and persistence of fenthion and dimethoate in the marine environment”.

Proceedings of the 10th International Conference on Environmental Sciences and Technology. Kos island, Greece, 5-7 September 2007. A1160-A1167.

[13] F.A. Tarbah, H. Mahler, O. Temme, T. Daldrup.

“An analytical method for the rapid screening of organophosphate pesticides in human biological samples and foodstuffs”

Forensic Sci. Int. 2001, 121(1-2), 126-133.

[14] J. Hernández-Borges, J.C. Cabrera, M.A. Rodríguez-Delgado, E.M. Hernández-Suárez, V.G. Saúco.

“Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain)”
Food Chemistry, 2009, 113 (1), 313-319.

[15] F.A. Tarbah, A.M. Shaheen, F.A. Benomran, A.I. Hassan, Th. Daldrup.

“Distribution of dimethoate in the body after a fatal organophosphate intoxication”
Forensic Sci. Int. 2007, 170, 129-132.

[16] Y. Tao, Y. Wang, L. Ye, H. Li, Q. Wang.

“Simultaneous Determination of Omethoate and Dichlorvos by Capillary Electrophoresis”
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2008, 81, 210-215.

[17] Y. Bai, J. Chen, H. Mu, C. Zhang, B. Li

“Reduction of dichlorvos and omethoate residues by O₂ plasma treatment”
Agric. Food Chem. 2009, 57, 6238-6245.

[18] Li Li, Wei Li, Jing Ge, Yijun Wu, Shuren Jiang, Fengmao Liu.

“Use of graphitic carbon black and primary secondary amine for determination of 17 organophosphorus pesticide residues in spinach”
Sep. Sci. 2008, 31, 3588 – 3594.

[19] J. Harald, M. Eddleston, R. Eddie Clutton, F. Worek, H. Thiermann.

“Simultaneous quantification of the organophosphorus pesticides dimethoate and omethoate in porcine plasma and urine by LC–ESI-MS/MS and flow-injection-ESI-MS/MS”
Chromatogr. B, 2010, 878, 1234–1245.

[20] H. John, F. Worek, H. Thiermann

“LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning”
Anal. Bioanal. Chem. 2008, 391, 97-116.

- [21] A.M. Rodrigues, V. Ferreira, V.V. Cardoso, E. Ferreira, M.J. Benoliel.
“Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry”
J. Chromatogr. A 2007, 1150, 267–278.
- [22] F. Mazzotti, L. Di Donna, B. Macchione, L. Maiuolo, E. Perri, G. Sindona.
“Screening of dimethoate in food by isotope dilution and electrospray ionization tandem mass spectrometry”
Mass Spectrom. 2009, 23(10), 1515–1518.
- [23] A. De Nino, L. Di Donna, F. Mazzotti, E. Muzzalupo, E. Perri, G. Sindona, A. Tagarelli.
“Absolute method for the assay of oleuropein in olive oils by atmospheric pressure Chemicals ionization tandem mass spectrometry”
A. Anal. Chem. 2005, 77(18), 5961-14.
- [24] G. Yang, X. Xu, M. Shen, W. Wang, L. Xu, G. Chen, F. Fu.
“Determination of organophosphorus pesticides by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry with collective sample-introduction technique”
Electrophoresis 2009, 30, 1718-1723.
- [25] Y. Tao, Y. Wang, L. Ye, H. Li, Q. Wang.
“Simultaneous determination of omethoate and dichlorvos by capillary electrophoresis”
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2008, 81, 210-215.
- [26] Y. Chen, Z. Lin, J. Chen, J. Sun, L. Zhang, G. Chen.
“New capillary electrophoresis–electrochemiluminescence detection system equipped with an electrically heated Ru(bpy)₃²⁺/multi-wall-carbon-nanotube paste electrode”
J. Chromatogr. A 2007, 1172, 84–91.
- [27] M. Chen, Y. Wang
“A direct polarographic method for the determination of dimethoate”
Fenxi-Huaxue 1984, 12(4), 300-302.

- [28] T. Galeano Daz, A. Guiberteau, M. D. López Soto, J. M. Ortiz.
“Determination of Dimethoate in Olive Oil by Adsorptive Stripping Square-Wave Voltammetry”
Electroanalysis 2006, 18(7), 695 – 702.
- [29] X. Huang, D. Du, X. Gong, J. Cai, H. Tu, X. Xu, A. Zhang.
“Composite Assembly of Silver Nanoparticles with Avidin and Biotinylated AChE on Gold for the Pesticidal Electrochemical Sensing”
Electroanalysis 2008, 20(4), 402 – 409.
- [30] H. Shi, J.T.B. Strode, L.T. Taylor, E.M. Fujinari.
“Feasibility of SFC-Chemiluminescent Nitrogen Detection with Open Tubular Columns”
J. Chromatogr. A. 1996, 734(2), 303-310.
- [31] Q.L. Li, X.F. Wang, D.X. Yuan.
“Solid-phase extraction of polar organophosphorous pesticides from aqueous samples with oxidized carbon nanotubes”
J. Environ. Monit., 2009, 11, 439-444.
- [32] M. Guardia Rubio A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, M.L. Fernández de Córdoba.
“Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry”
J. Sep. Sci. 2006, 29, 1578 – 1586.
- [33] E. Ballesteros and M. J. Parrado.
“Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters”
J. Chromatogr. A, 2004, 1029(1-2), 267-273.

- [34] F. Hernández, J. V. Sancho, O. Pozo, A. Lara and E. Pitarch
“Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub- $\mu\text{g/l}$ level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry”
J. Chromatogr. A, 2001, 939(1-2), 1-11.
- [35] A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, M.C. Pablos Espada, M.D. Gil Garcia, F.J. Arrebola.
“Comparison of gas chromatography with NPD, MS, and tandem MS in the multiresidue analysis of pesticides in environmental waters”
Chromatographia, 2000, 52 (9-10), 614-620.
- [36] V.K. Karamfilova, T.W. Filemanb, K.M. Evansb, R.F.C. Mantourab.
“Determination of dimethoate and fenitrothion in estuarine samples by C-18 solid-phase extraction and high-resolution gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection”
Anal. Chim. Acta 1996, 335, 51-61.
- [37] S. Lacorte, P. Viana, M. Guillamon, R. Tauler, T. Vinhas and D. Barceló
“Main findings and conclusions of the implementation of Directive, 76/464/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal, April 1999–May 2000)”.
J. Environ. Monit., 2001, 3, 475–482.
- [38] F. Liu, G. Bischoff, W. Pestemer, W. Xu, A. Kofet
“Multi-Residue Analysis of Some Polar Pesticides in Water Samples with SPE and LC–MS–MS”
Chromatographia, 2006, 63(5-6), 233-237.
- [39] A.M. Rodrigues, V. Ferreira, V.V. Cardoso, E. Ferreira, M.J. Benoliel.
“Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry”
J. Chromatogr. A, 2007, 1150(1-2), 267-278.

- [40] C. Planas, A. Puig, J. Rivera, J. Caixach.
“Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction: Estimation of the uncertainty of the analytical results”
J. Chromatogr. A, 2006, 1131(1-2), 242-252.
- [41] A. Claver, P. Ormad, L. Rodríguez, J.L. Ovelleiro.
“Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain)”
Chemosphere, 2006, 64(9), 1437-1443.
- [42] J. Ruzicka, E.H. Hansen.
“Flow injection analysis I. New concept of fast continuous flow analysis”
Anal. Chim. Acta, 1975, 78, 145-147.
- [43] K.K. Stewart, G.R. Beecher, P. Hare.
“Rapid analysis of discrete samples: the use of nonsegmented continuous flow”
Anal. Biochem., 1976, 70, 167-173.
- [44] A.M. García Campaña, W. Baeyens, X. Zhang, F. Alés, I. Gámiz.
“Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminiscence”
Ars Pharmaceutica, 2001, 42, 81-107.
- [45] C.F. Poole.
“New trends in solid-phase extraction”
Trends Anal. Chem. 2003, 22 (6), 362-373.
- [46] L. Ruano Miguel.
“Desarrollos metodológicos en cromatografía de gases y electroforesis capilar”
Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, 2009.

[47] L. Vidal Martínez

“Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra”

Tesis Doctoral, Universidad de Alicante, 2009.

[48] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull.

“Tendencias en sorbentes poliméricos para la extracción en fase sólida de compuestos polares”

Cromatografía y Técnicas afines, 2010, 31 (1), 3-27.

[49] E. Benfenati, P. Facchini, P. Pierucci, R. Faneli.

“Identification of organic contaminants in leachates from industrial waste landfills”

Trends Anal. Chem., 1996, 15, 305-310.

[50] J. S. Fritz

“Analytical solid-phase extraction”

Ed. John Wiley and Sons, Reino Unido (Inglaterra), 1999.

[51] H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau.

“Multiresidue methods using SPE techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters”

J. Chromatogr. A, 2000, 885, 217-236.

[52] J. Martínez, M. Pablos, A. Garrido, F. Arrebola.

“Pesticide trace analysis using SPS and GC with electron-capture and tandem mass spectrometric detection in water samples”

J. Chromatogr. A, 2000, 867, 235-245.

[53] R. Cela, R. Lorenzo, C. Casais.

“Técnicas de separación en química analítica”

Editorial Síntesis, Madrid, 2002.

[54] J. Otero Romani.

“Desarrollo de nuevos métodos de extracción en fase sólida para la preconcentración de metales traza en el agua de mar: evaluación de un soporte de C-18 y de polímeros de impronta iónica. Aplicación al estudio de la Ría de Arousa”

Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 2009.

[55] H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau.

“Multiresidue methods using SPE techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters”

J. Chromatogr. A, 2000, 885, 217-236.

[56] R. Carabias Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, E. Herrero Hernández, J. Hernández Méndez.

“Simultaneous determination of phenyl- and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection.

Anal. Chim. Acta. 2004, 517, 71-79.

[57] Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España.
Consulta: julio 2011.

<http://www.marm.es/>

[58] European directive 80/778/EEC

European Commission, Brussels, 1993.