



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y
ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL
LAVADO DE ACEITUNA SOBRE LA
ELIMINACIÓN DE RESIDUOS DE
PLAGUICIDAS: NUEVAS METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS Y SITUACIÓN REAL EN
ALMAZARAS**

**PRESENTADA POR:
MARÍA GUARDIA RUBIO**

**DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. MARÍA JOSÉ AYORA CAÑADA
DR. D. ANTONIO RUIZ MEDINA**

JAÉN, 21 DE FEBRERO DE 2008

ISBN 978-84-8439-463-1

Nombre y apellidos del autor:

MARÍA GUARDIA RUBIO

Título de la Tesis Doctoral:

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL LAVADO DE ACEITUNA SOBRE LA ELIMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS: NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y SITUACIÓN REAL EN ALMAZARAS

I.S.B.N.:

978-84-8439-463-1

Fecha de Lectura:

21 DE FEBRERO DE 2008

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura:

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento de Química Física y Analítica

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis:

Dirección de la Tesis	Dra. Dña. María José Ayora Cañada Dr. D. Antonio Ruiz Medina
Presidente/a del Tribunal	Dra. Dña. Agustina Guiberteau Cabanillas
Vocales	Dr. D. Luis Cuadros Rodríguez Dra. Dña. Antonia Garrido Frenich Dra. Dña. M ^a . José González de la Huebra Tejador
Secretario/a	Dra. Dña. Pilar Ortega Barrales

Calificación Obtenida:

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

Resumen

El uso generalizado de productos fitosanitarios en la práctica agrícola actual puede tener como consecuencia la presencia de residuos de plaguicidas en aceituna, y por consiguiente en el aceite de oliva virgen. La sensibilización de los consumidores por los posibles efectos nocivos sobre la salud de estos plaguicidas viene siendo motivo de atención y preocupación en el sector oleícola. Por ello, se hace cada vez más necesario el desarrollo de métodos multirresiduos que permitan analizar de forma rápida y eficaz tanto de la materia prima (aceituna) como del producto final (aceite de oliva).

En la presente memoria se han desarrollado y validado una serie de métodos de análisis de treinta y dos plaguicidas en aceituna, aceite, agua y suelo/lodo mediante cromatografía de gases con detectores de captura electrónica y termoiónico específico (CG-ECD/TSD) y cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (CG-MS/MS).

El método de análisis de multirresiduos en aceituna (a niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$) se basa en una extracción usando un homogenizador de alta velocidad y una etapa posterior de clean-up del extracto mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). El proceso de análisis de multirresiduos en aceite (a niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$) consiste en una extracción líquido-líquido seguida por un proceso de clean-up basado en GPC mientras que el método de determinación de plaguicidas en agua consiste en una extracción en fase sólida (SPE). Por último, en el caso de suelo y lodos se lleva a cabo una extracción líquido-sólido en ultrasonidos. En el caso de los lodos se necesitó de una etapa de clean-up adicional basada en SPE.

Se han llevado a cabo estudios a nivel de laboratorio y a nivel de almazara. Con el estudio a nivel del laboratorio se pretendía evaluar el comportamiento de los plaguicidas

detectados más frecuentemente en la aceituna frente al lavado. Para ello, se contaminó aceituna con las formulaciones comerciales de estos plaguicidas y se llevaron a cabo experiencias de lavado de dicha aceituna contaminada durante un periodo de 9 semanas, analizando mediante CG-MS/MS tanto el agua de lavado como las aceitunas una vez lavadas.

El estudio a nivel de almazara pretende estudiar la influencia que la forma de recoger la aceituna, así como el lavado de la misma, tienen sobre la presencia de residuos de plaguicidas. Se han seleccionado tres almazaras para llevar a cabo las tomas de muestras (agua de lavadoras, aceituna y aceite), dos de ellas procesan por separado la aceituna que se recoge del suelo (aceituna de suelo) y la que se recoge directamente del árbol (aceituna de vuelo) y la otra almazara procesa la aceituna sin separar.

Se ha llevado a cabo también un estudio de los ciclos de lavado de aceituna en las almazaras, es decir, la evolución de la contaminación del agua usada para lavar aceituna desde que empieza a funcionar la lavadora con agua limpia hasta que ésta se cambia y comprobar cómo esto afecta a la efectividad del lavado. Por último, se ha llevado a cabo un estudio a escala de laboratorio sobre el uso de coagulantes y/o floculantes para mejorar el proceso de lavado y hacer posible reciclar esta agua.

Abstract

The widespread use of plaguicides in modern agricultural production may cause the presence of residues in olives and consequently, in virgin olive oil. Consumer's awareness about negative effects of these plaguicide residues on health is cause for concern in the olive oil sector. For this reason, it is necessary to develop multiresidue analysis methods to allow the rapid analysis of both olives and the final product (olive oil).

In the present work, various methods of analysis of thirty-two plaguicides in olives, olive oil, water and soil/mud have been developed and validated. They are based in the use of gas chromatography with electron capture and thermoionic specific detectors (CG-ECD/TSD) and gas chromatography-tandem mass spectrometry (CG-MS/MS).

The analytical multiresidue method in olives (at $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels) is based on homogenization using a high speed homogenizer followed by a clean-up of the extract by means of gel permeation chromatography (GPC). The analytical procedure for the determination of plaguicides in olive oil (at $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels) consists on a liquid-liquid extraction of plaguicides followed by GPC while the analysis method of plaguicides in water is based on solid phase extraction (SPE). Finally, the analysis of soil and mud samples consists of a sonicated liquid-solid extraction. In the case of mud samples, an additional clean-up stage based on SPE was necessary.

Studies at laboratory scale have been carried out to evaluate the behavior of the most frequently detected plaguicides once they come in contact with olives and how washing affects them. For this purpose, olives were sprayed with commercial formulations of these plaguicides and washing experiments were performed every week for a 9 weeks period, analyzing both washing water and washed olives by CG-MS/MS.

The olive mill scale study aims with the study of the influence of harvesting methods and washing on the presence of plaguicide residues in olives. Samples (washing water, olives and olive oil) were collected in three selected olive mills. Both of them process olives harvested from the ground (ground olives) and olives harvested directly from the tree (tree olives) separately and the other one process olives without any separation.

The evolution of washing water contamination since the washing device starts washing with clean water until it is changed (washing cycles) has been studied to check how it may affect washing efficiency. Finally, a study of the use of coagulants/flocculants at laboratory scale has been performed to improve the washing process, making possible for this water to be recycled.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD
DEL LAVADO DE ACEITUNA
SOBRE LA ELIMINACIÓN DE
RESIDUOS DE PLAGICIDAS:
NUEVAS METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS Y SITUACIÓN REAL
EN ALMAZARAS

MARÍA GUARDIA RUBIO

tesis doctoral

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Antonio Ruíz Medina y M^a José Ayora Cañada, directores de esta Memoria de Investigación (además de buenos amigos), por su apoyo durante estos años y por el esfuerzo que han realizado para sacar este trabajo adelante a pesar de los momentos complicados que hemos pasado. Sin ellos, este trabajo no habría sido posible.

Gracias también a Antonio Molina Díaz, coordinador del proyecto mediante el cual ha sido posible el desarrollo de esta Memoria, por creer en mí y no escatimar poniendo a mi disposición todos los medios necesarios, así como al resto de miembros del proyecto pertenecientes al departamento, especialmente a M^a Luisa Fernández de Córdova, por brindarme su ayuda siempre que lo he necesitado, tanto en el terreno científico como en el personal.

Asimismo, quiero agradecer a Rosa M^a Marchal López por todo lo que aprendí a su lado (no sólo cromatografía sino también acerca del funcionamiento de un laboratorio) durante mi breve pero fructuosa estancia en el Laboratorio CM-Europa. Y como no, a Loli, Urbani, Juanjo y especialmente a Pedro por hacerme tan amena mi estancia allí y por el buen rato que paso con ellos cada vez que vuelvo.

Por supuesto, gracias a los maestros de las almazaras (y a los operarios de las mismas) que han colaborado haciendo posible la toma de muestras y facilitándonos amablemente todos los datos que necesitábamos.

A todos mis compañeros del Departamento de Química Física y Analítica, por esos ratos entrañables que compartimos, tanto en la Universidad como fuera de ella, puesto que la mayoría se han convertido en buenos amigos. Gracias a Juana, Eulogio, Macarena, Bienve, Juanfra, Paco, Tomás, Chema y Manolo.

Mención aparte merecen M. José Ruedas y Ana, las primeras personas que encontré

cuando llegué al laboratorio y que siempre me brindaron su apoyo a lo largo de estos años, llegando a convertirse en excelentes amigas. Y por supuesto, a Javi, nunca olvidaré todo lo que me ayudó y aguantó, sobre todo en el último tramo de la tesis. Fue y sigue siendo un gran apoyo para mí. Me siento muy afortunada por contar con amigos como vosotros.

Gracias también a Julia, M^a José Palomar, Cazalla, Juanp, Esther, Emilio y tantos otros, por estar ahí para compartir los buenos momentos y prestarme su hombro en los no tan buenos.

Quiero también expresar lo afortunada que me siento por el respaldo incondicional que siempre he tenido por parte de mis padres y hermanos, que han creído en mí y me han apoyado siempre.

Por último, a Alfonso, por estar a mi lado brindándome su apoyo, animándome y derrochando grandes dosis de paciencia; pero sobre todo, gracias por tu cariño.

A mis padres

A Alfonso

Índice

I. RESUMEN	11
II. JUSTIFICACIÓN E INTRODUCCIÓN	17
1. El olivo y el aceite de oliva	20
1.1 Composición química y organoléptica del aceite de oliva.....	21
1.2 Proceso de elaboración del aceite de oliva	22
1.3 Denominación y definición de los aceites de oliva y de orujo	33
2. Plaguicidas en el olivar.....	34
2.1 Clasificación	35
2.2 Riesgos principales.....	39
2.3 Plagas en el olivar.....	40
2.4 Uso de herbicidas en el olivar	45
2.5 Plaguicidas objeto de este estudio.....	46
2.6 Legislación referente a los plaguicidas en estudio	65
3. Preparación de la muestra	68
3.1 Procedimientos de extracción.....	68
3.2 Procedimientos de clean-up	74
4. Cromatografía de gases	76
4.1 Instrumentación en CG	76
4.2 Espectrometría de masas (MS)	86
III. OBJETIVOS	96

IV. ANTECEDENTES.....	99
1. Métodos de análisis de plaguicidas	100
1.1 Principales sistemas de detección.....	102
1.2 Métodos de extracción y clean-up.....	105
1.2.1 Agua	106
1.2.2 Suelo/lodos	108
1.2.3 Aceite	110
1.2.4 Aceituna	113
2. Evaluación de la influencia de la recolección y el lavado de aceituna sobre la presencia de residuos de plaguicidas	115
2.1 Influencia del método de recolección.....	115
2.2 Influencia del proceso de lavado de aceituna en las almazaras.....	116
2.3 Influencia de la contaminación del agua de lavado. Descontaminación.....	118
V. DISCUSIÓN CONJUNTA DE RESULTADOS.....	119
1. Reactivos, materiales e instrumentación.....	120
1.1 Reactivos y materiales.....	120
1.2 Instrumentación y aparatos	122
2. Puesta a punto de métodos analíticos.....	126
2.1 Condiciones de la separación cromatográfica.....	127
2.2 Método de determinación de plaguicidas en agua.....	135
2.2.1 Tratamiento previo de la muestra	136
2.2.2 Procedimiento de extracción y clean-up	136
2.2.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación	137
2.2.4 Validación de los métodos cromatográficos.....	141
2.2.4.1 Calibración	141
2.2.4.2 Parámetros analíticos	145
2.2.4.3 Repetibilidad, reproducibilidad y estudio de recuperación	150

2.3 Método de determinación de herbicidas en suelo y lodo	153
2.3.1 Tratamiento previo de la muestra	153
2.3.2 Procedimiento de extracción y clean-up	153
2.3.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación	157
2.3.4 Validación de los métodos cromatográficos.....	159
2.3.4.1 Calibración	159
2.3.4.2 Parámetros analíticos	160
2.3.4.3 Repetibilidad, reproducibilidad y estudio de recuperación	161
2.3.5 Comparación entre UASE y MASE	162
2.4 Método de determinación de plaguicidas en aceite.....	165
2.4.1 Tratamiento previo de la muestra.....	165
2.4.2 Procedimiento de extracción y clean-up	165
2.4.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación	167
2.4.4 Validación de los métodos cromatográficos.....	172
2.4.4.1 Calibración	172
2.4.4.2 Parámetros analíticos	173
2.4.4.3 Repetibilidad, reproducibilidad y estudio de recuperación	177
2.4.5 Ejercicio de intercomparación entre laboratorios	178
2.5 Método de determinación de plaguicidas en aceituna.....	180
2.5.1 Tratamiento previo de la muestra	181
2.5.2 Procedimiento de extracción y clean-up	181
2.5.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación	184
2.5.4 Validación de los métodos cromatográficos.....	190
2.5.4.1 Calibración	190
2.5.4.2 Parámetros analíticos	191
2.5.4.3 Repetibilidad, reproducibilidad y estudio de recuperación	194
2.5.5 Extracción con Abencor	196
2.5.6 Comparación entre el método Abencor y el método propuesto.....	199

2.6 Control interno de la calidad en el análisis de plaguicidas.....	200
3. Estudio a nivel de laboratorio	202
3.1 Influencia de lavados sucesivos.....	204
3.2 Persistencia de plaguicidas en la aceituna	206
4. Estudio a nivel de almazara	210
4.1 Almazaras seleccionadas y toma de muestras	210
4.2 Influencia del método de recolección y el lavado en la presencia de residuos de plaguicidas en aceituna y aceite de oliva.....	212
4.2.1 Influencia del método de recolección	214
4.2.2 Eficiencia del proceso de lavado.....	217
4.2.3 Residuos en aceite de oliva	224
5. Eficacia del proceso del lavado de aceituna en almazaras y propuesta de un método de descontaminación	227
5.1 Estudio de los ciclos de lavado en almazaras	227
5.2 Optimización del proceso de descontaminación del agua de lavado.....	231
5.2.1 Selección del agente coagulante	232
5.2.2 Selección del material adsorbente	234
VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	237
VII. ANEXO	242

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGC	Control Automático de Ganancia (Automatic Gain Control)
AMD	Desarrollo Automático del Método (Automatic Method Development)
CCC	Control Continuo de la Calibración
CG	Cromatografía de Gases
CG-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CI	Ionización Química (Chemical Ionization)
CID	Disociación Inducida por Colisión (Collision Induced Dissociation)
CL	Cromatografía Líquida
ECD	Detector de Captura Electrónica (Electron Capture Detector)
EFC	Control Electrónico del Flujo (Electronic Flow Control)
EI	Impacto Electrónico (Electron Impact)
GPC	Cromatografía de Permeación en Gel (Gel Permeation Chromatography)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)
IR	Índice de Refracción
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
LLE	Extracción Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Extraction)
LMR	Límite Máximo de Residuos
LPME	Microextracción en Fase Líquida (Liquid Phase Microextraction)

MASE	Extracción con Disolvente Asistida por Microondas (Microwave Assisted Solvent Extraction)
MRM	Monitorización de Reacciones Múltiples (Multiple Reaction Monitoring)
MS	Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry)
MS/MS	Espectrometría de Masas en tandem
MSPD	Dispersión de Matriz en Fase Sólida (Matrix Solid Phase Dispersion)
PI	Patrón Interno
PTV	Inyector de Temperatura Programable
RSD	Desviación Estándar Relativa (Relative Standard Deviation)
SBWE	Extracción con Agua Subcrítica (Subcritical Boiling Water Extraction)
SDME	Microextracción sobre una Sola Gota (Single Drop Microextraction)
SFE	Extracción con Fluidos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction)
SIM	Monitorización Selectiva de Iones (Selected Ion Monitorization)
SPE	Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
SPME	Microextracción en Fase Sólida (Solid Phase Microextraction)
TPP	Trifenilfosfato
t_R	Tiempo de Retención
TSD	Detector Termoiónico Específico (Thermoionic Specific Detector)
UASE	Extracción con Disolvente Asistida por Ultrasonidos (Ultrasonic Assisted Solvent Extraction)

I. Resumen

I. RESUMEN

El uso generalizado de productos fitosanitarios en la práctica agrícola actual puede tener como consecuencia la presencia de residuos de plaguicidas en aceituna, y por consiguiente en el aceite de oliva virgen. La sensibilización de los consumidores por los posibles efectos nocivos sobre la salud de estos plaguicidas viene siendo motivo de atención y preocupación en el sector oleícola. Por ello, se hace cada vez más necesario el desarrollo de métodos multiresiduos que permitan analizar de forma rápida y eficaz tanto de la materia prima (aceituna) como del producto final (aceite de oliva).

En la presente memoria se han desarrollado una serie de métodos de análisis de treinta y dos plaguicidas en aceituna y aceite mediante cromatografía de gases con detectores de captura electrónica y termoiónico específico (CG-ECD/TSD) y cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (CG-MS/MS).

El método de análisis de multiresiduos en aceituna (a niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$) se basa en una extracción con éter de petróleo usando un homogenizador de alta velocidad y una etapa posterior de clean-up del extracto mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) empleando acetato de etilo/ciclohexano (1:1) como fase móvil. Ello permite la separación de los plaguicidas de baja masa molecular de los triglicéridos de mayor masa molecular. Se llevó a cabo una validación satisfactoria del método propuesto mediante los tres sistemas cromatográficos evaluando la linealidad de las calibraciones de los plaguicidas, límites de detección y cuantificación, recuperación, repetibilidad y reproducibilidad. Asimismo, y con el objetivo de conocer la proporción de plaguicidas que se transfieren al aceite durante el proceso de producción del aceite de oliva en las almazaras, se llevó a cabo una comparación entre los resultados que se obtuvieron en el aceite extrayéndolo con el método propuesto y los que se obtienen mediante el método abencor, que es un proceso más parecido al que se lleva a cabo en las almazaras, encontrándose que los plaguicidas más frecuentemente detectados se transfieren al aceite de oliva en una proporción muy alta.

El proceso de análisis de multiresiduos en aceite (a niveles de $\mu\text{g g}^{-1}$) consiste en una extracción líquido-líquido con acetonitrilo saturado en n-hexano seguida por un proceso de clean-up basado en GPC como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo la validación satisfactoria del método mediante los tres sistemas cromatográficos de la misma manera que se ha descrito para el caso del análisis en aceituna. Además, se participó en un ejercicio de intercomparación de laboratorios (JUNAN11/02) aplicando el método CG-MS/MS al análisis de una muestra de aceite fortificado con plaguicidas organoclorados, comprobándose que todos los valores obtenidos estaban dentro del rango “satisfactorio”.

En la presente memoria también se ha llevado a cabo un estudio de la influencia de las etapas preliminares en la producción de aceite de oliva (recogida y lavado) sobre la presencia de residuos de plaguicidas en aceituna y aceite. Para ello, además de los métodos analíticos descritos anteriormente, también se han desarrollado métodos de análisis multiresiduos del agua de las lavadoras de aceituna así como del lodo que contienen las mismas.

El método de determinación de plaguicidas en agua consiste en una extracción en fase sólida (SPE) usando cartuchos de silicagel C-18, utilizando diclorometano como eluyente. El método se validó satisfactoriamente evaluando los parámetros que se han descrito previamente para el caso de los métodos en aceituna y aceite y con calibraciones hechas con patrones preparados en disolvente para los sistemas TSD y MS/MS y con patrones preparados en matriz para el ECD. Se obtuvieron límites de detección de niveles de ng L^{-1} mediante los tres sistemas de detección.

Asimismo, se ha desarrollado un método para la determinación de cinco herbicidas ampliamente utilizados en el olivar mediante CG-ECD/TSD en suelo y lodo. La extracción de los herbicidas se lleva a cabo mediante extracción líquido-sólido utilizando una mezcla ciclohexano/acetona en ultrasonidos. En el caso de los lodos se necesitó de una etapa de clean-up adicional basada en SPE usando alúmina. El método se validó satisfactoriamente y los LD obtenidos fueron menores de 2 ng g^{-1} .

Se han llevado a cabo estudios a nivel de laboratorio y a nivel de almazara. Con el estudio a nivel del laboratorio se pretendía evaluar el comportamiento de los plaguicidas detectados más frecuentemente en la aceituna frente al lavado. Para ello, se contaminó aceituna con las formulaciones comerciales de estos plaguicidas y se llevaron a cabo experiencias de lavado de dicha aceituna contaminada durante un periodo de 9 semanas, analizando mediante CG-MS/MS tanto el agua de lavado como las aceitunas una vez lavadas. Se observó como la fracción de plaguicidas que podía eliminarse mediante el lavado disminuía con el tiempo después del tratamiento. El lavado llevado a cabo un día después del tratamiento era el más efectivo reduciendo los niveles de residuos, especialmente para la simazina. La concentración de residuos en aceituna lavada empezaba a disminuir alrededor de la sexta semana debido a procesos de degradación. En el caso de los herbicidas seleccionados se ha observado que el proceso de lavado llevado a cabo en las almazaras podría ser efectivo siempre y cuando los residuos se encuentren en la aceituna como consecuencia de un contacto breve con suelo contaminado. Esto ocurre cuando la aceituna se tira al suelo y se recoge mediante sopladoras y cepillos.

El estudio a nivel de almazara pretende estudiar la influencia que la forma de recoger la aceituna, así como el lavado de la misma, tienen sobre la presencia de residuos de plaguicidas. Se han seleccionado tres almazaras para llevar a cabo las tomas de muestras (agua de lavadoras, aceituna y aceite), dos de ellas procesan por separado la aceituna que se recoge del suelo (aceituna de suelo) y la que se recoge directamente del árbol (aceituna de vuelo) y la otra almazara procesa la aceituna sin separar. Los análisis llevados a cabo mediante CG-MS/MS han revelado que endosulfan sulfato y dos herbicidas (diuron y terbutilazina) son los plaguicidas que se detectan más frecuentemente en aceituna y aceite de oliva. El método de recogida de la aceituna tiene una influencia decisiva en las concentraciones de herbicidas detectadas en aceituna y se ha comprobado como lavado llevado a cabo rutinariamente en almazaras era efectivo eliminando la contaminación superficial de herbicidas en aceituna de suelo. Sin embargo, incluso después del lavado, el aceite de oliva procedente de aceituna de

suelo presentaba concentraciones de residuos de herbicidas mayores que los que se detectaron en las aceitunas de vuelo.

Se ha llevado a cabo también un estudio de los ciclos de lavado de aceituna en las almazaras, es decir, la evolución de la contaminación del agua usada para lavar aceituna desde que empieza a funcionar la lavadora con agua limpia hasta que ésta se cambia y comprobar cómo esto afecta a la efectividad del lavado de aceituna en términos de eliminación de residuos de plaguicidas. Para ello, se tomaron muestras de agua de las lavadoras y de aceituna (antes y después de lavarse) a lo largo del ciclo de lavado en las almazaras que tienen líneas separadas de aceituna de suelo y vuelo. Se seleccionó la línea de suelo para que los resultados fueran más significativos al estar esta aceituna más contaminada. Los plaguicidas encontrados más frecuentemente fueron tres herbicidas: diuron, oxifluorfen (añadido al estudio en esta última fase) y terbutilazina, así como el insecticida endosulfan y su producto de degradación endosulfan-sulfato. Al principio del ciclo de lavado, los residuos de los tres herbicidas se eliminaban eficientemente. Sin embargo, a medida que se iba contaminando el agua de las lavadoras, disminuía la eficiencia del lavado, especialmente en el caso de los residuos de diuron y terbutilazina. Puesto que en muchas ocasiones este agua no se cambia tanto como sería deseable debido a la escasez de agua en las zonas dedicadas al cultivo del olivar, como el sur de España sería necesario disponer de un método de descontaminación con el fin de reciclar el agua de estas lavadoras. En este sentido se ha llevado a cabo un estudio a escala de laboratorio sobre el uso de coagulantes y/o floculantes para mejorar el proceso de lavado y hacer posible reciclar esta agua. Después de la optimización del procedimiento se ha seleccionado FeCl_3 como coagulante y carbón activo como adsorbente puesto que se ha mostrado su efectividad en la eliminación, tanto de los sólidos en suspensión como de los residuos de plaguicidas.

II. Justificación e introducción

I. JUSTIFICACIÓN E INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

La aplicación de productos fitosanitarios sobre las superficies vegetales es uno de los principales métodos de lucha contra plagas y enfermedades del olivar. En este sentido, existe una preocupación creciente por la posible presencia de residuos de estos productos en las aceitunas y, por consiguiente, en el aceite, dado el carácter lipofílico de la mayoría de ellos. Estudios realizados en los últimos años revelaban la presencia de residuos de diversos productos fitosanitarios (principalmente insecticidas y fungicidas) empleados en el olivar, aunque en general los niveles detectados no superaban los límites máximos de residuos^{1,2}.

Por otra parte, la generalización de los sistemas de no laboreo en el olivar ha conducido a un incremento en la utilización de herbicidas de pre-emergencia residuales para obtener buenos rendimientos. Estos herbicidas se aplican extensivamente en Octubre o Noviembre antes de las lluvias de invierno y de la germinación de las malas hierbas³. Su uso, próximo a la recolección, así como la proliferación del empleo de sopladoras, sistemas para recolectar aceituna de suelo de forma muy rápida, que junto a la aceituna recogen gran cantidad de tierra, maximiza el riesgo de la contaminación del fruto.

Se hace, por ello, necesaria una evaluación de la situación actual en cuanto a la presencia de residuos de plaguicidas en aceituna con el fin de proponer, en caso afirmativo, estrategias que permitan su eliminación.

¹ E. Botitsi, P. Kormali, S. Kontou, A. Mourkojanni, E. Stavrakaki, D. Tsipi, *J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 231.

² "Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein", European Commission, Health & Consumer, Protection directorate General. Report 2002.

³ R. Santiago de Prado, A.R. Franco, *Commun. in Agric. and Applied Biol. Sci.* 68 (2003) 409.

El objeto del presente trabajo es, por una parte, desarrollar y validar métodos de análisis fiables que posibiliten la determinación de residuos de plaguicidas en aceite y aceitunas, así como, estudiar la influencia de las etapas preliminares del proceso de obtención del aceite sobre los niveles de estos plaguicidas, incidiendo especialmente en el proceso de lavado de la aceituna. Dicha etapa es especialmente relevante en el caso de la aceituna recogida del suelo con sopladoras pues el volumen de suelo que la acompaña puede alcanzar incluso un 20% del peso total. Debido a la escasez de agua en nuestro entorno, las almazaras suelen reutilizar las aguas de lavado, incorporando en algunos casos (muy pocos) algún tipo de proceso de depuración. No existen hasta la fecha estudios que evalúen si la contaminación progresiva del agua afecta a la efectividad del lavado. Para abordar este estudio será necesario también desarrollar métodos de análisis de las aguas de lavado de aceitunas, así como, de los lodos de las lavadoras. Este estudio se encuentra avalado por el Proyecto CAO 01-025 de la Consejería de Agricultura y Pesca, Dirección General de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (Junta de Andalucía), llevando por título: EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL LAVADO DE LA ACEITUNA SOBRE LA ELIMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS. ESTUDIO DE LA SITUACIÓN REAL EN ALMAZARAS Y PROPUESTAS DE MEJORA.

INTRODUCCIÓN

1. EL OLIVO Y EL ACEITE DE OLIVA

Actualmente, el olivo (*Olea europea*; variedad sativa) es uno de los principales cultivos de todos los países de la cuenca Mediterránea, especialmente en el centro y sur de España e Italia, así como, en Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos. Su situación actual es el resultado de un lento, pero continuo desarrollo de las distintas civilizaciones que habitaron las costas del Mediterráneo y zonas del interior de Oriente Medio.

El aceite de oliva virgen se obtiene del fruto del olivo mediante medios físicos, sin ningún tratamiento químico. Es el único aceite vegetal que se consume en crudo (sin refinar). Debido a sus características sensoriales y nutricionales, este producto es uno de los componentes más importantes de la reconocida dieta mediterránea⁴.

El aceite de oliva es el aceite vegetal comestible más importante en los países mediterráneos y Portugal. Es también, quizás, el cultivo más antiguo reseñado por la Historia. A primera vista, los aceites de oliva parecen tener escasa importancia cuando se observan sus datos estadísticos a nivel mundial, tanto de producción como de consumo. Sin embargo, en términos del valor del producto, los aceites de oliva representan un notable porcentaje del comercio mundial debido a que su valor por unidad de producto es significativamente mayor que el de otros aceites alternativos (aceites de soja, palma, colza, girasol y maíz).

La importancia económica de los aceites de oliva varía de un país a otro y puede llegar a ser crucial en los países mediterráneos. Además de sus profundas raíces en la historia y civilización, el sector del aceite de oliva contribuye de manera notable a la actividad económica de varios de estos países. En España, por ejemplo, más de medio millón de agricultores

⁴ A.H. Stark, Z. Madar, *Nutrition Reviews* 60 (2002) 170.

trabajan en el cultivo del olivar, cuyo sector demanda anualmente 46 millones de jornadas agrícolas.

1.1 Composición química y organoléptica del aceite de oliva

Los triglicéridos constituyen el 98-99% del aceite de oliva, pero además, éste también contiene ácidos grasos libres, cuya proporción es variable y depende del grado de hidrólisis de los triglicéridos. La composición de los ácidos grasos en el aceite de oliva depende de la variedad, las condiciones climáticas y la localización geográfica del olivar. La norma comercial del Consejo Oleícola Internacional (COI) para los aceites de oliva y de orujo de oliva, y la norma alimentaria del Codex Alimentarius han fijado los porcentajes máximos y mínimos de cada ácido graso en el aceite de oliva. El aceite de oliva está básicamente compuesto de ácidos grasos monoinsaturados. Atendiendo al tipo de insaturación los porcentajes serían del 72% para ácidos grasos monoinsaturados, 14% para los ácidos grasos poliinsaturados, y el resto (14%) para los ácidos grasos saturados.

También existen componentes menores del aceite de oliva, indicadores específicos de su autenticidad físicoquímica y que le añaden propiedades sensoriales y biológicas únicas:

- El escualeno es el representante mayoritario de los hidrocarburos terpénicos del aceite de oliva (300-700 ppm), mientras que el β -caroteno, precursor biológico de la vitamina A, se encuentra en muy pequeñas cantidades (a nivel de unas pocas ppm).
- Los alcoholes triterpénicos (24-metilen-cicloartenol, junto con cicloartenol, α -amirina y β -amirina) son especialmente importantes desde el punto de vista biológico. El eritrodíol también lo es desde el punto de vista analítico en la detección de la presencia de aceite de orujo de oliva.

- Los esteroides constituyen la huella analítica que permite la autenticación del aceite de oliva, sobre todo porque el contenido de β -sitosterol aparente es menor del 93% del total de esteroides.
- Los tocoferoles, especialmente el α -tocoferol o vitamina E (150-300 ppm), son importantes antioxidantes.
- Los compuestos fenólicos, algunos de los cuales proporcionan el característico sabor del aceite de oliva, incrementan sus propiedades antioxidantes.
- Alrededor de cien compuestos aromáticos, cuya composición química depende de la variedad, condiciones climáticas y calidad del aceite, se encuentran también presentes.

1.2 Proceso de elaboración del aceite de oliva

La tecnología de extracción oleícola, o elaiotecnia, representa un eje fundamental para poder obtener un aceite de oliva virgen de elevada calidad (virgen extra). Las operaciones fundamentales del proceso de elaboración del aceite de oliva virgen se desarrollan a continuación.

➤ Recolección de la aceituna

La recolección, aun siendo operación independiente de la elaboración propiamente dicha, influye sensiblemente en las características del aceite. Desde el punto de vista del almazarero, hay que tener en cuenta dos factores en la recolección: la época en que debe realizarse y el sistema a emplear.

En cuanto a la época, la aceituna debe ser recogida en el momento de su madurez óptima, considerando como tal el estado en que el fruto tenga la máxima cantidad de aceite y de mejores características.

Con respecto al sistema de recolección debe tenerse siempre presente la consideración de “zumo de fruto” que hay que otorgar al aceite, por lo tanto, deben utilizarse sistemas que no deterioren las aceitunas, produciéndoles heridas, magullamientos y evitar también roturas de ramas o de brotes tiernos del árbol. El aceite de buena calidad se obtiene de aceitunas recogidas directamente del árbol de forma manual (ordeño o vareo) mediante rastrillos especiales de plástico que permiten a los obreros agrícolas separar las aceitunas de las ramas y acelerar el trabajo. Además, se utilizan escaleras de mano para alcanzar las ramas más altas del árbol, y se extienden redes bajo los árboles para recoger las aceitunas. A veces también se recogen las aceitunas de forma mecánica, existiendo distintos tipos de máquinas vibradoras manejadas desde tractores (excéntrica con cable, vibradores de inercia y, fundamentalmente, vibradores multidireccionales) o por operarios.

La recogida manual en olivos de más de 4-5 metros se torna imposible, incluso con el uso de escaleras. Por lo general los troncos son demasiado anchos para permitir el uso de un vibrador y las aceitunas caen espontáneamente al suelo cuando están muy maduras. La recogida se alarga y, en los años de gran producción las aceitunas se recogen del suelo hasta el final de la primavera. Respecto a la recogida de las aceitunas del suelo, esta se facilita dejando limpia de hierbas y lisa la zona que cubre la copa del árbol. De esta forma, los operarios pueden repetidamente repasar la zona con barredoras y aspiradoras hasta recoger las aceitunas caídas del árbol. La calidad del aceite obtenido de estas aceitunas es pobre debido a que son muy evidentes los defectos organolépticos, como el sabor a moho y tierra, que son típicos de este tipo de recolección.

La aceituna que llega a las almazaras lleva un porcentaje variable de materias extrañas de muy diversa índole, tales como tierra, piedras, hojas, maderas y hierbas, entre otros. Para poder

obtener aceites de calidad, evitar la interferencia de estos productos en las características organolépticas y, por otro lado, paliar en gran medida el desgaste y avería de la maquinaria, principalmente de los molinos, es indispensable eliminar, en lo posible, todos estos cuerpos extraños. Para ello se emplean: (1) limpiadoras que utilizan aire para la separación de los objetos menos pesados que la aceituna y (2) lavadoras que utilizan agua como medio de solubilización y eliminación de los cuerpos más pesados. También, en los últimos años, algunas almazaras han sustituido el sistema de lavado de la aceituna por inmersión por un proceso de ducha en un sistema continuo (principalmente para las aceitunas de vuelo). En el caso de la aceituna de suelo este proceso de ducha por aspersión se aplica al fruto antes de lavarlo en la lavadora. Este proceso presenta la ventaja de no acumular la suciedad de unas aceitunas con otras.

A continuación, se ilustra el proceso de limpieza con sopladoras para eliminar el material más ligero. Las aceitunas caen por la parte trasera desde la cinta transportadora hacia la ducha, y en esa caída las aventadoras expulsan gran parte de las hojas y ramas que las acompañan.



Figura 1. Limpieza de la aceituna por medio de aventadoras y ducha.



Figura 2. Ducha de las aceitunas.

La Figura 2 muestra como se duchan las aceitunas en un sistema continuo hasta llegar a la balanza para ser pesadas o bien a la lavadora (si procede). La Figura 3 muestra el lavado de aceituna en la lavadora. Son transportadas mediante una cinta, se sumergen en el agua de la lavadora y van saliendo por flotación y agitación; por último, éstas caen por la cinta que está en pendiente.



Figura 3. Lavado de aceitunas en lavadoras.

Con respecto al almacenamiento, el ideal en la industria almazarera sería poder realizar la extracción del aceite al mismo ritmo que se efectúa la recolección del fruto, pero en la mayor parte de los casos esto no es posible, por lo que es necesario conservar el fruto en la almazara. El objetivo principal de la conservación es conseguir mantener el fruto sin alteración de las características del aceite, sin que su costo se eleve de forma sensible. En la Figura 4 se muestra como, después de la limpieza y pesada, las aceitunas se transportan (mediante cintas transportadoras) al *troje*, donde esperan ser procesadas.



Figura 4. Almacenamiento de la aceituna antes de ser procesada.

➤ Preparación

La técnica oleícola tiene por objeto separar el aceite de oliva virgen, en forma de fase oleosa continua (sin alteraciones en su composición y de sus características organolépticas), de los demás componentes de la aceituna. Las fases del proceso de elaboración del aceite se describen a continuación⁵.

⁵ R. Aparicio, J. Harwood, Manual del aceite de oliva, Ed. AMV (1ª Ed), Madrid 2003.

Molienda

El primer paso necesario para obtener el aceite de oliva, cualquiera que sea el método de separación a utilizar, es la molturación de las aceitunas para destruir la estructura de los tejidos vegetales que la forman y liberar la mayor parte del aceite contenido en las vacuolas de las células del mesocarpio. Las pequeñas gotitas de aceite se van reuniendo entre sí, formando gotas de tamaño muy variable, las cuales entran en contacto directo con la fase acuosa presente en la pasta, procedente del agua de vegetación y de los residuos de agua con que los frutos se han tratado previamente a su molienda.

Los equipos que tradicionalmente se han utilizado para la realización de esta fase son los molinos de empiedros, troncocónicos o cilíndricos. Actualmente, en las almazaras de nueva construcción se utilizan los molinos de martillos o los de discos dentados.

Batido

Todos los trituradores empleados en la extracción de aceite de oliva, en especial los metálicos, necesitan el complemento de dislaceradores y batidoras; los primeros para efectuar el cizallamiento de las partes que no hayan sido suficientemente tratadas en el molino y las segundas para reunir en una fase oleosa continua las gotas de aceite dispersas en la pasta molida. Debido a las bajas temperaturas en que se efectúa el trabajo en las almazaras y con el fin de facilitar la salida de los aceites, se dota normalmente a las batidoras de un sistema de calefacción, que consiste normalmente en una doble pared o tubería interior por donde circula un fluido calefactor.

También hay que considerar el uso de coadyuvantes tecnológicos que se añaden en la fase de batido para facilitar la separación del aceite de los demás componentes de la masa de aceituna y, por tanto, incrementar el rendimiento de extracción mejorando el agotamiento de los subproductos. El único coadyuvante tecnológico permitido, por no tener acción química ni

bioquímica, es el silicato de magnesio hidratado, más comúnmente llamado talco, de fórmula $\text{Mg}(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2$.

➤ Separación sólido-líquido

Esta fase constituye la parte fundamental del proceso de obtención del aceite y está basada en la separación de los líquidos contenidos en la pasta de aceituna. Se puede realizar por diferentes sistemas: filtración selectiva, extracción por presión y extracción por centrifugación de pasta, en tres o dos fases.

Filtración selectiva

Durante la preparación de la pasta de aceitunas, por acción del batido, se produce la separación de una cierta cantidad de aceite en fase continua que reúne condiciones superiores al que se obtiene posteriormente por intervención de la presión u otro sistema de separación de fases sólido-líquidas.

Extracción por presión

La forma tradicional de conseguir en elaiotecnia la separación de la fase líquida de la sólida ha sido mediante la presión que suministra la prensa hidráulica, en la que se utilizan discos filtrantes (capachetas) como soportes de la pasta a ser extraída.

Extracción por centrifugación de la pasta

Se puede considerar a este sistema como el procedimiento moderno de realizar la separación sólido-líquido por utilización de la fuerza centrífuga. Se lleva a cabo en equipos que funcionan en "fase dinámica", es decir, donde los sólidos se van desplazando a lo largo del eje de giro y

se descargan continuamente. Esto se lleva a cabo en un decantador centrífugo horizontal que consta esencialmente de un rotor cilíndrico-cónico giratorio y un rascador helicoidal de eje hueco. Al ser sometida la pasta de aceituna a la acción de la fuerza centrífuga, los sólidos se adosan a la pared del rotor y son arrastrados hacia un extremo por el tornillo sinfín. Los líquidos (aceite y fase acuosa) forman anillos concéntricos más interiores en función de su densidad y son enviados al exterior por conducciones diferentes.

En el sistema de centrifugación continuo de tres fases (Figura 5), los tres componentes de la pasta salen por tres salidas independientes, siendo éstos: una sólida (orujos) formada por huesos de aceituna, pulpa y piel, y dos partes líquidas, aceite de oliva y agua de vegetación (agua añadida + agua del fruto). La separación no es perfecta, ya que un pequeño porcentaje de orujos y agua de vegetación permanece en el aceite de oliva y una pequeña cantidad de aceite puede ser recuperada del agua de vegetación.

Existe también el sistema de centrifugación continuo de dos fases (Figura 6), más utilizado actualmente, en donde el decantador no necesita que se le añada demasiada agua a la pasta, separándose así en dos fases: aceite y una combinación de orujos y agua residual (alpeorujos). Éste último tiene un tratamiento más complicado para los extractores.

Los esquemas de los procesos básicos de funcionamiento en función de que el decantador sea de tres o de dos fases son los siguientes:

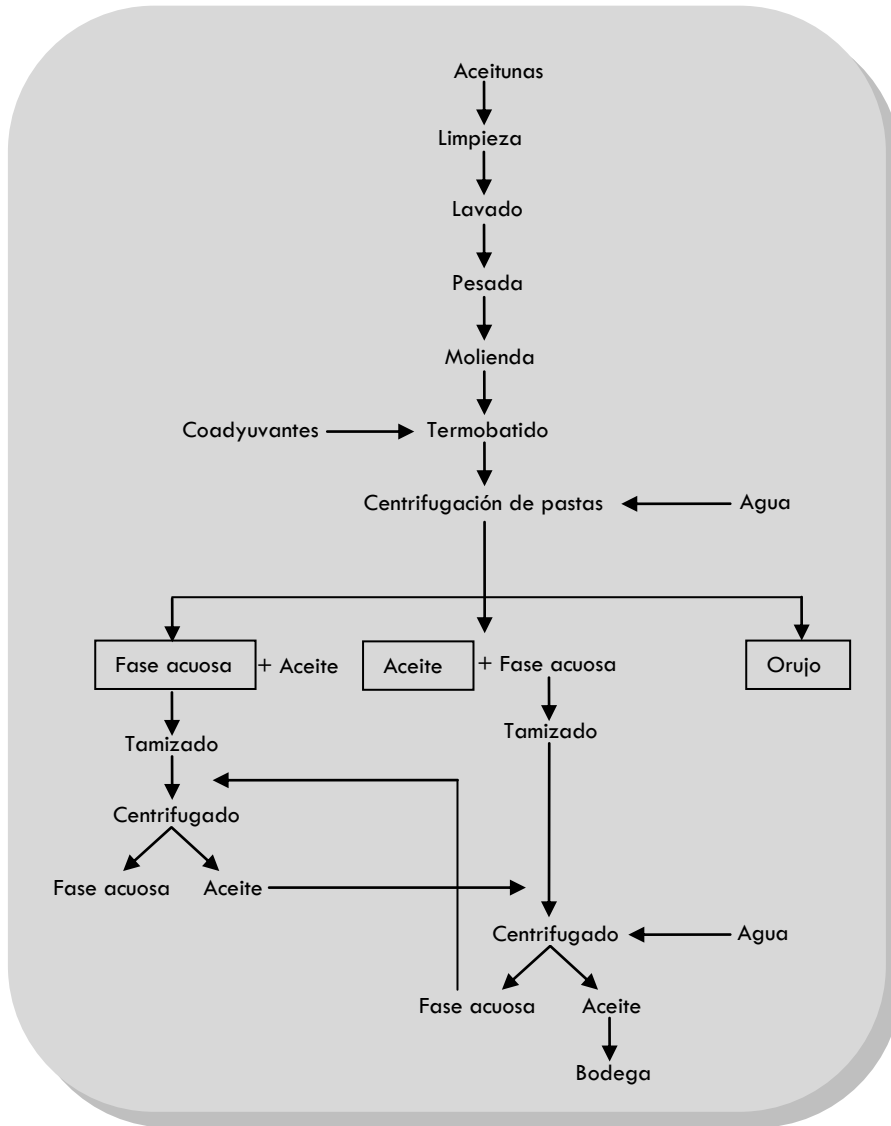


Figura 5. Sistema de centrifugación en 3 fases.

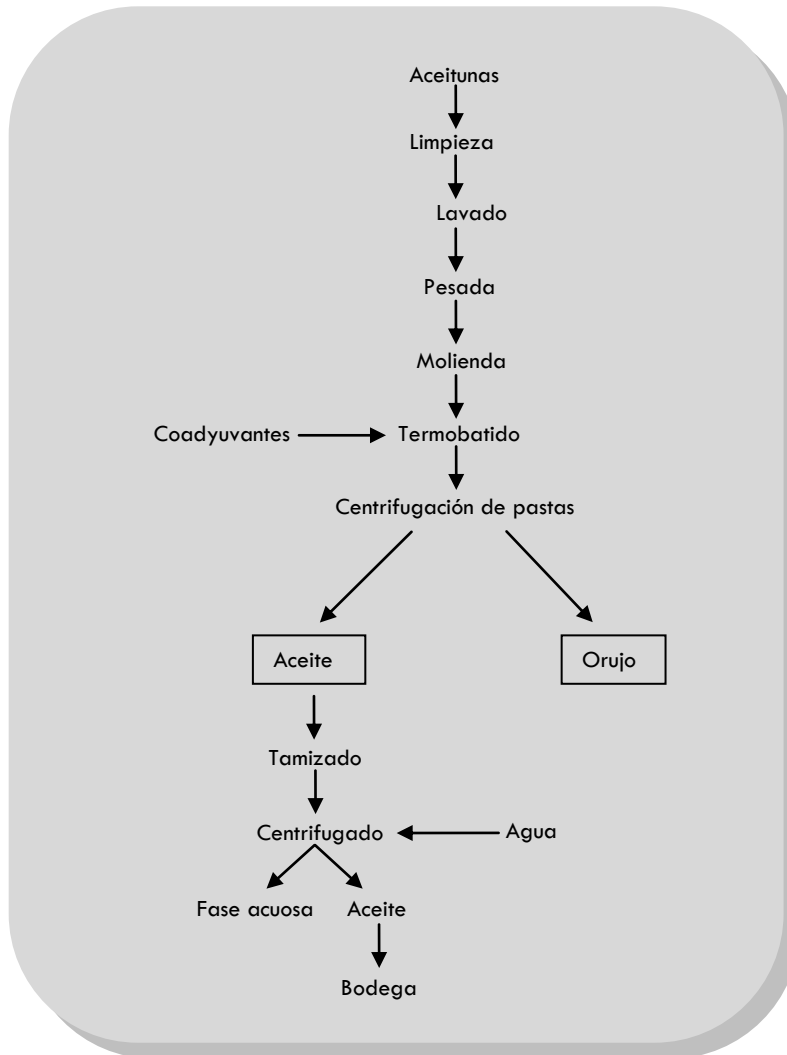


Figura 6. Sistema de centrifugación en 2 fases.

➤ Separación líquido-líquido

El líquido que se obtiene de las centrifugas no es solamente aceite, sino que normalmente, al salir del decantador, lleva una pequeña mezcla del mismo con el agua de vegetación e incluso un pequeño porcentaje de materias sólidas. Hay que llevar a cabo una separación perfecta de las tres fases (acuosa, aceite y materias sólidas) para la obtención de aceites de calidad.

Los procedimientos existentes en la actualidad para llevar a cabo esta separación son los siguientes:

Decantación

Desde muy antiguo ha sido el método empleado para conseguir la separación. Esta separación se realiza en una serie de depósitos de mampostería, revestidos de azulejos y comunicados entre sí, o de otros materiales como el poliéster con fibra de vidrio o el acero inoxidable.

Centrifugación

En las almazaras se aplican cada vez más las separadoras centrífugas, lo que permite efectuar la separación de las fases de una forma continua y rápida. En los sistemas continuos de tres y dos salidas, las fases líquidas previamente separadas en el decantador centrífugo y tamizadas, se someten nuevamente a la acción de las separadoras de platos. Se consigue de este modo, con la adición de cierta cantidad de agua, limpiar los aceites y, de forma similar pero independiente en la fase acuosa, recuperar la fracción de aceite que le acompaña. Esta etapa también se ha recogido en los esquemas de la Figura 5 y figura 6.

1.3 Denominación y definición de los aceites de oliva y de orujo

El aceite de oliva, como se dijo anteriormente, es el aceite procedente exclusivamente del fruto del olivo, con exclusión de los aceites obtenidos utilizando disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. La clasificación de los distintos aceites, teniendo en cuenta los principales parámetros de calidad,

son los que se muestran en la Tabla 1⁶. El resto de características se ajustan a las indicadas en el anexo I del reglamento nº 136/66/CE.

Tabla 1. Características de los aceites de oliva.

Categoría	Acidez (%)	Índice de peróxidos (mEq O ₂) kg ⁻¹	Ceras (mg kg ⁻¹)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	Delta-K
<i>Aceite de oliva virgen extra</i>	≤0.8	≤20	≤250	≤2.50	≤0.22	≤0.01
<i>Aceite de oliva virgen</i>	≤2.0	≤20	≤250	≤2.60	≤0.25	≤0.01
<i>Aceite de oliva lampante</i>	>2.0	-	≤300	-	-	-
<i>Aceite de oliva refinado</i>	≤0.3	≤5	≤350	-	≤1.10	≤0.16
<i>Aceite de oliva</i>	≤1.0	≤15	≤350	-	≤0.90	≤0.15
<i>Aceite de orujo de oliva crudo</i>	-	-	>350	-	-	-
<i>Aceite de orujo de oliva refinado</i>	≤0.3	≤5	>350	-	≤2.00	≤0.20
<i>Aceite de orujo de oliva</i>	≤1.0	≤15	>350	-	≤1.70	≤0.18

2. PLAGUICIDAS EN EL OLIVAR

La denominación de plaguicidas, o su equivalente pesticidas, incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y en sus propiedades a pesar de su utilización común.

Según el Real Decreto núm. 3349/83 de 30 de noviembre de 1983 sobre “Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas”, se define plaguicida como la sustancia o ingrediente activo, así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a cualquiera de los fines siguientes:

⁶ *Reglamento de la Comisión Europea No 2568/91* de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Modificado por: *Reglamento de la Comisión Europea No 1989/2003* de 6 de noviembre de 2003.

- Combatir los agentes nocivos para 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.
- Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales.

2.1 Clasificación

Los plaguicidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos⁷.

- a) Según el destino de su aplicación pueden considerarse:
- Plaguicidas de uso fitosanitario o productos fitosanitarios: los destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de vegetales.
 - Plaguicidas de uso ganadero: los destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
 - Plaguicidas de uso en la industria alimentaria: los destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.
 - Plaguicidas de uso ambiental: los destinados al saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.

⁷ Real Decreto No. 3349/83 de 30 Noviembre relativo a productos químicos, Reglamentación Técnico-Sanitaria para fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas.

- Plaguicidas de uso en higiene personal: aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el hombre.
 - Plaguicidas de uso doméstico: cualquier preparado destinado para aplicación por personas no especialmente cualificadas en viviendas o locales habitados.
- b) Atendiendo a su acción específica pueden efectuarse múltiples clasificaciones, siendo una de las más utilizadas la decimal, en la que se consideran:
- Insecticidas.
 - Acaricidas.
 - Fungicidas.
 - Nematocidas, desinfectantes y fumigantes en general.
 - Herbicidas.
 - Fitorreguladores y productos afines.
 - Molusquicidas, rodenticidas y varios.
 - Específicos post-cosecha y simientes.
 - Protectores de maderas, fibras y derivados.
 - Plaguicidas específicos varios.
- c) Según el estado de presentación o sistema utilizado en su aplicación, características que determinan en buena medida la facilidad de penetración en el organismo del individuo expuesto. Según este criterio se pueden considerar los grupos:
- Gases o gases licuados.
 - Fumigantes y aerosoles.
 - Polvos con diámetro de partícula inferior a 50 μ .
 - Sólidos, excepto los cebos y los preparados en forma de tabletas.
 - Líquidos.

- Cebos y tabletas.
- d) Desde el punto de vista de su constitución química, siendo los más importantes los siguientes grupos:
- Arsenicales.
 - Carbamatos.
 - Derivados de cumarina.
 - Derivados de urea.
 - Dinitrocompuestos.
 - Organoclorados.
 - Organofosforados.
 - Organometálicos.
 - Piretroides.
 - Tiocarbamatos.
 - Triazinas.

Algunos de estos grupos engloban varias estructuras diferenciadas, por lo que, en caso de interés, es posible efectuar una subdivisión de los mismos.

- e) Atendiendo a su grado de peligrosidad para las personas, los plaguicidas se clasifican de la siguiente forma:
- En cuanto a su grado de toxicidad, en las siguientes categorías:
 - De baja peligrosidad: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables
 - Nocivos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada

- Tóxicos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte
- Muy tóxicos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte

La clasificación toxicológica de los plaguicidas en estas categorías se realiza atendiendo básicamente a su toxicidad aguda, expresada en DL50 (dosis letal al 50 por 100) por vía oral o dérmica para la rata, o en CL50 (concentración letal al 50 por 100) por vía respiratoria para la rata, atendiendo principalmente a las vías de acción más importantes de cada compuesto.

- En cuanto a otros efectos:

- Corrosivos: los que en contacto con tejidos vivos pueden ejercer sobre ellos una acción destructiva
- Irritantes: los no corrosivos que, por contacto directo, prolongado o repetido con la piel o las mucosas, pueden provocar una reacción inflamatoria
- Fácilmente inflamables
- Explosivos: los que pueden explosionar bajo efecto de una llama o que son más sensibles a los choques o a la fricción que el dinitrobenceno

2.2 Riesgos principales

Los riesgos derivados de la utilización de plaguicidas pueden tener como causa su toxicidad u otros efectos (corrosivos, irritantes, inflamabilidad, explosivos). Estas causas de riesgo son comunes con la generalidad de los productos químicos, pero presentan una particularidad destacable en cuanto a la toxicidad, cuyo grado y características son especialmente importantes en los plaguicidas.

Los mecanismos de acción de los plaguicidas sobre el organismo presentan entre sí grandes diferencias. Para algunos productos estos mecanismos son bien conocidos, incluso a nivel molecular, pero para otros son prácticamente desconocidos. Por otra parte, incluso dentro de una misma familia química pueden encontrarse compuestos clasificables desde escasamente peligrosos hasta muy tóxicos. Todo ello hace muy difícil establecer generalidades en lo concerniente a la toxicidad de los plaguicidas.

Puede decirse que muchos compuestos organoclorados afectan al sistema nervioso central (depresión, narcosis), así como al hígado y al riñón. Se caracterizan también los organoclorados por acumularse en los tejidos grasos, de donde se eliminan de forma muy gradual. Los compuestos organofosforados y los carbamatos también afectan principalmente al sistema nervioso central, en este caso mediante un proceso de inhibición de la enzima colinesterasa. Los primeros actúan en forma irreversible, mientras que los segundos son inhibidores reversibles de esta enzima.

El control ambiental permite estimar el riesgo de exposición en función de la concentración del producto tóxico en aire, en el supuesto de que la penetración en el organismo tenga lugar tan sólo por inhalación, pero en el caso de los plaguicidas, cuya posibilidad de entrada por otras vías está confirmada, puede ser más interesante obtener información del verdadero grado de exposición personal a través de un control biológico. Este control puede consistir en la determinación directa del plaguicida o de sus metabolitos en un fluido biológico; tal sería el caso de la cuantificación de muchos plaguicidas organoclorados como el DDT, el dieldrín o el lindano en sangre o el pentaclorofenol en orina, así como del p-nitrofenol, el 1-naftol o el 2-isopropoxifenol en orina, como metabolitos que son del paration, del carbaril y del baygón, respectivamente. Las concentraciones encontradas se comparan con unos valores índices de exposición biológicos (BEI).

2.3 Plagas en el olivar

La aplicación foliar de plaguicidas sobre las superficies vegetales es uno de los principales métodos de lucha contra las diferentes plagas y enfermedades a las que el olivar, como otros cultivos, está expuesto.

Las plagas del olivo han cambiado muy poco desde que empezó a cultivarse y siguen siendo la *mosca* y el *prays* las más importantes. La *cochinilla*, tercera en importancia, se ha potenciado a partir de los años 60, a raíz de los tratamientos generalizados contra los anteriores. A continuación se describen resumidamente algunas de las plagas más importantes a las que se enfrenta el olivo en la actualidad⁸.

✓ Mosca del olivo

La mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), es la plaga más importante en el cultivo del olivar, encontrándose preferentemente en la zona mediterránea y estando ya presente en América (Estados Unidos, México) y en el sur de África.

Los daños que produce pueden ser directos por disminución de la producción, debidos a pérdida de peso y/o caída prematura de fruto, e indirectos por pérdida de calidad de los aceites producidos debido a que en las galerías hechas por la mosca en el fruto se instalan diferentes clases de hongos que pueden producir podredumbres.

La técnica cultural de realizar tratamientos con herbicidas debajo de los olivos para favorecer la recolección, es un factor que ayuda al crecimiento de las poblaciones de la mosca del olivo, limitadas tradicionalmente por las labores con arado que se realizaban bajo los árboles al final del invierno, práctica que destruía muchas de las pupas que allí se encontraban enterradas.

⁸ D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, El cultivo del olivar, Ed. Mundi-prensa Libros (5ª ed.), Madrid 2004.

✓ Prays o polilla del olivo

La polilla del olivo (*Prays oleae* Bern) es la segunda plaga en importancia económica del olivo después de la mosca. Está distribuido por todos los países de la Cuenca Mediterránea y afecta fundamentalmente al olivo, aunque también se encuentra en otras especies.

Puede ser responsable de la primera caída de las aceitunas o caída de junio, aunque estos daños están muy discutidos porque esta época coincide con una caída fisiológica que suele ser muy importante. En esta etapa el árbol todavía compensa en parte la producción con un mayor tamaño de la aceituna que permanece. Sin embargo, la segunda caída (septiembre) es mucho más dañina porque el fruto es ya de gran tamaño y el árbol no puede compensar la pérdida.

✓ Cochinilla

Hay varias especies de Cochinillas (Homoptera: Coccidae) que pueden afectar al olivo, siendo la más importante y generalizada la cochinilla de la tizne. Otras, como parlatoria, serpetta, piojo blanco y cotonet, pueden causar también daños importantes pero sólo se encuentran en zonas con características especiales.

La cochinilla de tizne (*Saissetia oleae* Bern) succiona la savia y excreta muchas sustancias azucaradas que impregnan al olivo y que en periodos húmedos sirve de alimento a los hongos negros (negrilla, fumagina) que recubren los tejidos vegetales como si fuese un fieltro y que disminuyen la fotosíntesis y la respiración. Los daños directos son escasos, pero la negrilla, que puede ser abundante incluso con bajas poblaciones de cochinilla, provoca la depresión del árbol, disminuyendo la brotación y la producción.

✓ Barrenillo del olivo

El Barrenillo (*Phloeotribus scarabaeoides*), es una especie que se encuentra distribuida en toda la Cuenca Mediterránea así como en zonas del sur de Europa, Siria y Asia Menor.

Con respecto a los daños que produce en el olivo, las galerías producidas por los adultos en las axilas de las ramas, hojas, inflorescencias y frutos, pueden producir la caída del órgano atacado, bien por sí misma, ayudada por el viento o en la operación de la recolección. El árbol afectado no puede desarrollarse, reduciendo su tamaño y disminuyendo la relación hoja/madera, por lo que su producción es escasa, llegando en casos extremos a ser improductivo. También es muy frecuente que se desarrollen otras plagas, como son, el areñuelo y la tuberculosis, que añaden otros daños indirectos a veces tan importantes como el producido por el barrenillo.

Una variedad es el barrenillo negro (*Hylesinus oleiperda*), en cuyo ciclo biológico pasa el invierno en estado larvario. A principios de mayo aparecen los adultos, que se dirigen a las ramas jóvenes del árbol, de 1 a 3 años, donde hacen una galería de puesta de aproximadamente 1 mm de longitud. Los daños están ocasionados porque la galería producida impide que la savia llegue con normalidad a ciertos brotes o ramas que se secan; también el árbol que está afectado sufre un debilitamiento general.

✓ Polilla del jazmín o glifodes

Este pirálido (*Margaronia Unionalis*) está presente de forma generalizada en nuestras comarcas olivareras prácticamente durante todo el año, no obstante, sólo altas poblaciones hacen necesarias medidas de control.

El aumento poblacional de esta especie suele producirse fundamentalmente en primavera-verano y en menor medida en otoño, coincidiendo con temperaturas más suaves y un mayor

crecimiento vegetativo. Normalmente la mayoría de los árboles jóvenes soportan la presencia de esta plaga sin necesidad de que se intervenga. Sólo en plantones o en árboles injertados, en el caso de encontrar un gran número de larvas y siempre que haya daños recientes en los brotes, sería necesario su control, a fin de proteger su formación.

✓ Abichado o euzofera

Este lepidóptero (*Euzophera Pingüis*) se encuentra en toda la Cuenca Mediterránea atacando al olivo y otras plantas de la misma familia. En Andalucía Occidental presenta dos generaciones, aunque es frecuente encontrar todos los estados de desarrollo durante todo el año, a excepción del invierno. Hacia febrero comienzan a verse las primeras crisálidas y según los años empiezan a volar los adultos, aunque es hacia abril cuando se suele producir el máximo de vuelo de esta generación.

Los daños que produce esta plaga son debidos a las galerías subcorticales de alimentación de las larvas. Las ramas, o el árbol, muestran un aspecto deprimido, amarillean y pueden secarse. Los ataques más graves suelen aparecer cuando se producen numerosas heridas, sean consecuencia de heladas, de granizadas al final de la primavera así como de injertos y plantaciones nuevas a un solo pie.

2.4 Uso de herbicidas en el olivar

Los herbicidas son sustancias cuyo objetivo es la lucha contra las malas hierbas, para evitar su competencia en el consumo de las reservas hídricas. Dichos productos son una herramienta muy útil de trabajo, que permiten al olivarero alcanzar varios objetivos: (1) reducir el número de labores, o suprimirlas, evitando además la competencia por el agua de las malas hierbas con el olivar, especialmente en determinados momentos del ciclo productivo y (2) mantener el suelo bajo la copa de los árboles limpio de malas hierbas, lo que facilita la recolección de las

aceitunas en el caso, probable en muchas variedades, en que los frutos caigan al suelo de forma natural tras su maduración.

Actualmente, su uso en el olivar se ha incrementado debido a la generalización de los sistemas de no laboreo.

Dependiendo de la época de aplicación, los herbicidas se clasifican en:

- Preemergencia; aquellos que se aplican a principios de otoño.
- Postemergencia temprana: son los que se aplican a mitad de otoño después de las primeras lluvias.
- Postemergencia: son los que se aplican en primavera para las malas hierbas perennes.

2.5 Plaguicidas objeto de este estudio

Se ha seleccionado un grupo de plaguicidas atendiendo a su uso intensivo en el cultivo del olivar, o en otros cultivos del área geográfica objeto del estudio. Además, se han incluido algunos cuyo uso está prohibido (DDT ó simazina) pero cuyos residuos todavía pueden persistir en el campo, pudiendo así detectarse. Los plaguicidas en estudio pertenecen a distintas clases químicas y entre ellos se encuentran: organoclorados, organofosforados, triazinas, ftalimidas y otros. A continuación se describen brevemente las principales características de cada uno de los plaguicidas incluidos dentro de cada clase química:

a) Plaguicidas organoclorados

- Aldrín ($C_{12}H_8Cl_6$, 1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a, hexahidro-exo-1,4-endo-5,8-dimetanonaftaleno)

Es un insecticida activo contra insectos por contacto o ingestión y por ello su uso principal es para el control de termitas en edificios, plagas de maíz mediante aplicación sobre el suelo y en la industria citrícola. Otros usos son para la protección de diversos cultivos, preservación de la madera, etc.

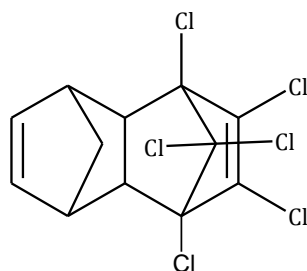


Figura 7. Estructura química del aldrín.

- *Dieldrín* ($C_{12}H_8Cl_6$, 1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi,1,4,4a,5,6,7,8, 8a,-octahidro-endo-1,4-exo-5,8-dimetanonaftaleno)

Se obtiene a partir del aldrín por epoxidación. Al igual que el aldrín, también es activo contra insectos por contacto o ingestión y por sus usos son los mismos.

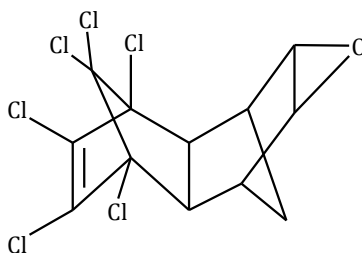


Figura 8. Estructura química del dieldrín.

- *Endrín* ($C_{12}H_8Cl_6O$, 1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7, 8,8a-octahidro-exo-1,4-exo-5,8-dimetanonaftaleno)

Es un insecticida estereoisómero del dieldrín y de estructura similar al aldrín. Se usa contra los insectos en cultivos como el maíz, arroz y algodón. También actúa como avicida y rodenticida.

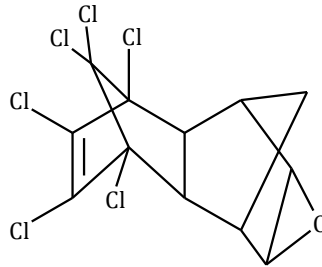


Figura 9. Estructura química del endrín.

- HCH ($C_6H_6Cl_6$, Hexaclorociclohexano)

Es un insecticida acaricida que actúa como estimulante del sistema nervioso de contacto y también tiene acción por ingestión. Su nombre se abrevia como HCH y es una mezcla de cinco formas isoméricas:

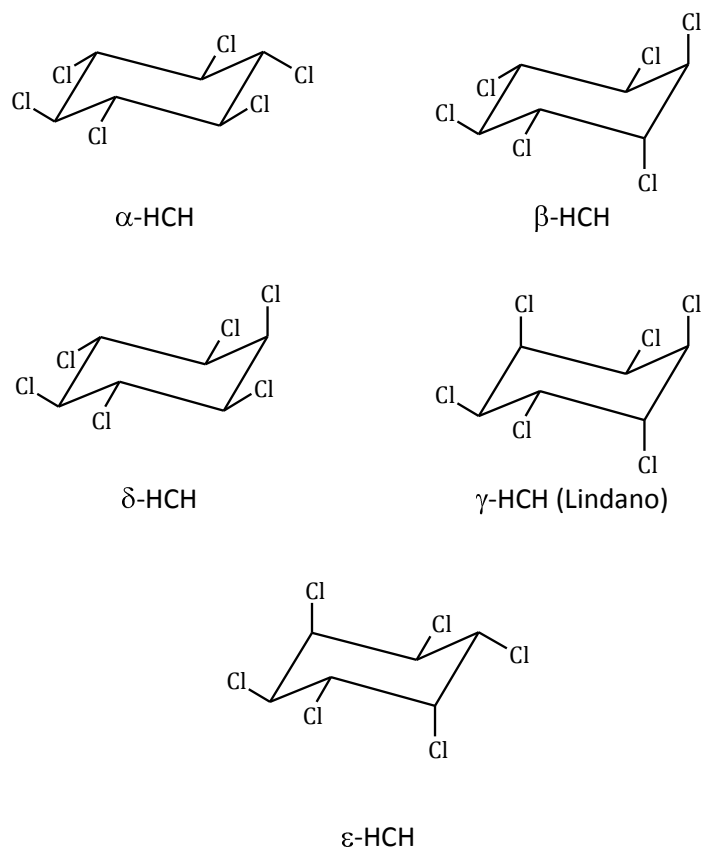


Figura 10. Estructura isomérica del HCH.

La forma épsilon es la menos abundante y por eso no se ha incluido en el estudio. La forma gamma (γ) se denomina también lindano y es la más conocida.

- *Heptaclor* ($C_{10}H_5Cl_7$, 1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno)

Es un insecticida perteneciente al grupo de los ciclodienos organoclorados. Su modo de acción es no-sistémico con acción por contacto, respiratoria e ingestión. Se usa para el control de termitas, hormigas e insectos del suelo en suelos cultivados y sin cultivar.

El principal producto de degradación del heptaclor en animales y en plantas es el heptaclor-epóxido, mezcla de dos isómeros: heptaclor-endo-epóxido y heptaclor-exo-epóxido.

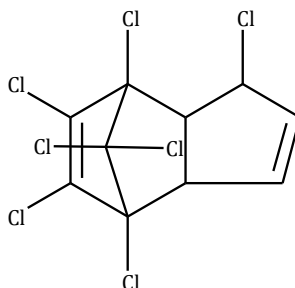


Figura 11. Estructura química del heptaclor.

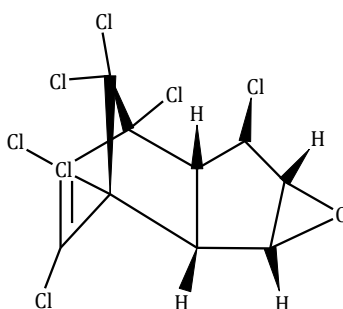


Figura 12. Estructura química del heptaclor-endo-epóxido ó heptaclor-epóxido-a.

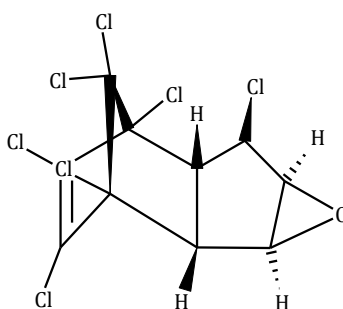


Figura 13. Estructura química del heptaclor-exo-epóxido ó heptaclor-epóxido-b.

- Endosulfan ($C_9H_6Cl_6O_3S$, 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina 3-oxo)

El endosulfan es una mezcla de dos estereoisómeros: α -endosulfan, con estereoquímica 3α , 5^{β} , 6α , 9α , 9^{β} - y que supone un 64-67% del endosulfan; β -endosulfan, con estereoquímica 3α , 5^{α} , 6β , 9β , 9^{α} -, que supone un 29-32%.

Es un insecticida acaricida no-sistémico con acción por contacto e ingestión. Se utiliza para el control de insectos y ácaros en una amplia variedad de cultivos, incluyendo frutales, viñas, olivos, patatas, etc.

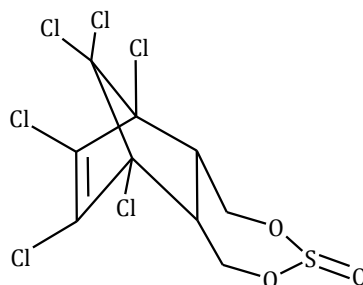


Figura 14. Estructura química del α -endosulfan.

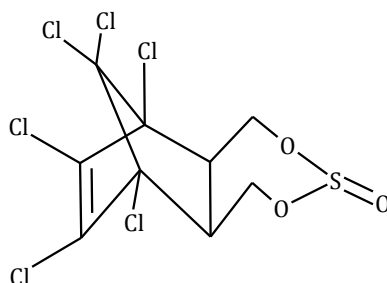


Figura 15. Estructura química del β -endosulfan.

- Endosulfan sulfato ($C_9H_6Cl_6O_4S$)

Es el principal metabolito del endosulfan, se degrada muy lentamente y es por esta razón el metabolito más importante que suele detectarse.

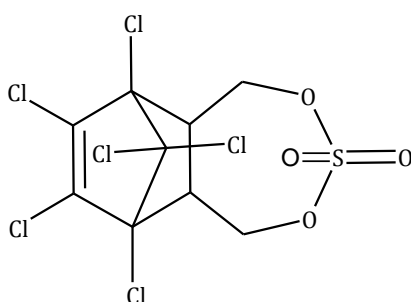


Figura 16. Estructura química del endosulfan sulfato.

- DDT ($C_{14}H_9Cl_5$, 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano)

Es un insecticida no-sistémico persistente con acción por contacto e ingestión que afecta al sistema nervioso, concretamente al balance de sodio de las membranas de los nervios. Fue muy popular en los sesenta contra los mosquitos que transmitían la malaria. Sin embargo, debido a su toxicidad y persistencia, se prohibió su uso y en los cultivos ha sido reemplazado por insecticidas menos persistentes.

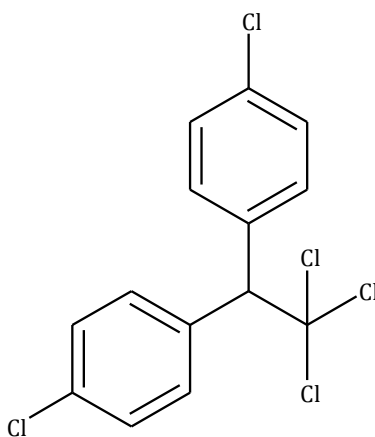


Figura 17. Estructura química del DDT.

- *DDD (C₁₄H₉Cl₅, 1,1'-(2,2-dicloroetilideno)-bis-(4-clorobenzeno))*

El DDD es un producto de degradación del DDT. Se usaba como insecticida acaricida, pero su uso está prohibido también. Una forma de DDD ha sido usada en medicina para tratar el cáncer de la glándula adrenal.

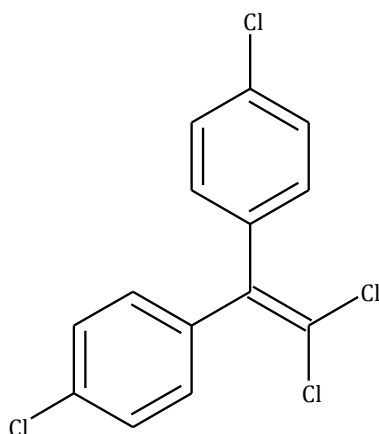


Figura 18. Estructura química del DDD.

b) Organofosforados

- *Dimetoato (C₅H₁₂NO₃PS₂, 2-dimetoxifosfinitioiltio-N-metalacetamida)*

Es un insecticida acaricida usado para matar ácaros e insectos, tanto sistémicamente como por contacto. Se usa contra una amplia gama de insectos en cereales, cítricos, café, olivar, té, tabaco, etc.

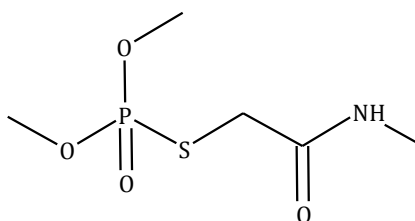


Figura 19. Estructura química del dimetoato.

- *Diazinon* ($C_{12}H_{21}N_2O_3PS$, *O,O*-diethyl *O*-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotioato)

Es un insecticida acaricida no sistémico, tiene acción respiratoria, por contacto e ingestión. Se usa en el control de insectos y ácaros en una amplia variedad de cultivos, incluyendo frutales, cítricos, viñas, olivos, plataneras, café, etc.

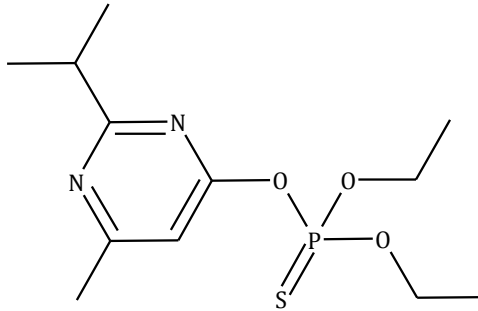


Figura 20. Estructura química del diazinón.

- *Formotion* ($C_6H_{12}NO_4PS_2$, 2-dimetoxifosfinitioiltio-N-formil-N-metalacetamida)

Es un insecticida organofosforado que actúa por contacto. Se usa para el control de arácnidos, chinches, pulgones, etc. en árboles frutales, viñas, aceitunas, cereales, caña de azúcar, aceite, etc.

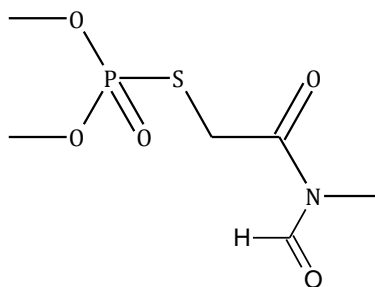


Figura 21. Estructura química del formotion.

- *Clorpirifos* ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, *O,O*-dietil *O*-e,5,6-tricloro-2-piridil fosfotioato)

Es un insecticida organofosforado no-sistémico de acción respiratoria, ingestión y por contacto. Se usa para el control de coleópteros, díptera, etc. En suelo y sobre follaje en alrededor de 100 cultivos, incluyendo cítricos, fresas, viñas, patatas, girasoles, etc.

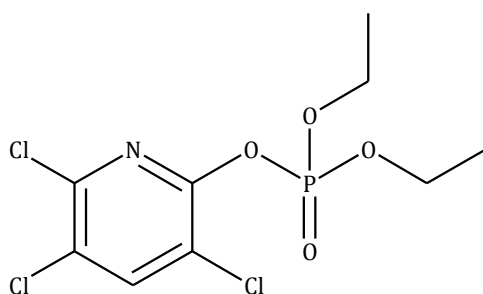


Figura 22. Estructura química del clorpirifos.

- *Clorpirifos-metil* ($C_7H_7Cl_3NO_3PS$, *O,O*-dimetil *O*-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato)

Es un insecticida acaricida de acción no sistémica, con acción por contacto, ingestión y respiratoria. Se usa para el control de coleópteros, díptera y varias plagas foliares en cultivos como cítricos, viñedos, fresas, tomates, etc.

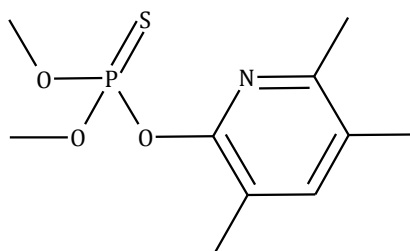


Figura 23. Estructura química del clorpirifos-metil.

- *Pirimifos-metil* ($C_{11}H_{20}N_3O_3PS$, *O-2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-il- O,O-dimetil fosfotioato*)

Es un insecticida acaricida de amplio espectro con acción respiratoria y por contacto. Se usa en el control de insectos y ácaros en verduras, caña de azúcar, maíz, arroz, cítricos, olivos, viñedos, etc.

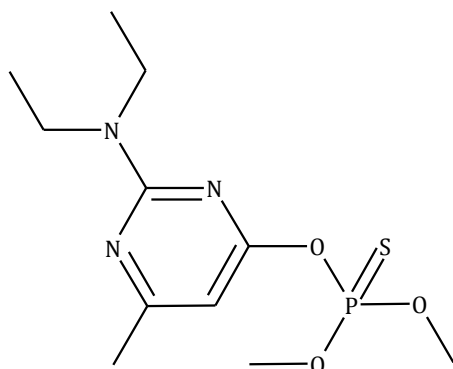


Figura 24. Estructura química del pirimifos-metil.

- *Malatión* ($C_{10}H_{19}O_6PS_2$, *S-1,2-bis (etoxicarbonil)etil O,O-dimetil fosfoditioato*)

Es un insecticida no-sistémico con acción respiratoria, por ingestión y contacto. Se usa para el control de coleópteros, díptera, hemíptera y otros insectos en un amplio intervalo de cultivos, incluyendo algodón, patatas, frutales, arroz y verduras.

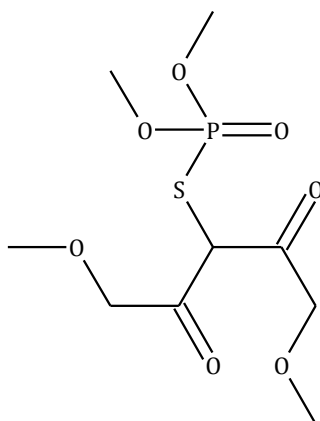


Figura 25. Estructura del malatión.

- *Fenitrotión* ($C_9H_{12}NO_5PS$, *O,O*-dimetil *O*-4-nitro-*m*-tolil fosfotioato)

Es un insecticida no-sistémico con acción por contacto e ingestión. Se usa para el control de insectos en cereales, fruta tropical, viñedos, arroz, azúcar de caña, etc.

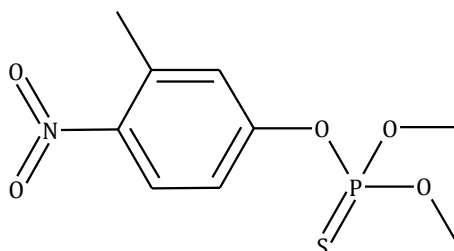


Figura 26. Estructura química del fenitrotión.

- *Metidatión* ($C_6H_{11}N_2O_4PS_3$, *3*-dimetoxifosfinotioiltiometil-*5*-metoxi-*1,3,4*-tiadiazol-*2(3H)*-ona)

Es un insecticida acaricida no-sistémico con acción por contacto y estomacal. Se usa para el control de un amplio intervalo de insectos y arácnidos en diversos cultivos como cítricos viñas, olivos, algodón, ect.

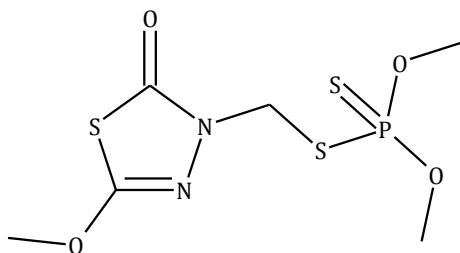


Figura 27. Estructura química del metidatión.

c) Triazinas

- *Simazina* ($C_7H_{12}ClN_5$, 6-cloro- N^2,N^4 -dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina)

Es un herbicida sistémico absorbido principalmente por las raíces, pero también por las hojas. Se usa para el control de la germinación anual de la hierba y forraje en granadas, frutas con hueso, cítricos, viñas, fresas, piñas, etc.

El uso de la simazina está actualmente prohibido ya que la Comisión Europea, a fecha de 10 marzo 2004, decidió la no inclusión de la misma en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE (relativa a la comercialización de productos fitosanitarios) y la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios con esta sustancia activa (2004/247/CE)⁹. Sin embargo, la simazina es un herbicida muy persistente, con un largo periodo de degradación, lo cual hace que pueda seguir acumulado en el suelo.

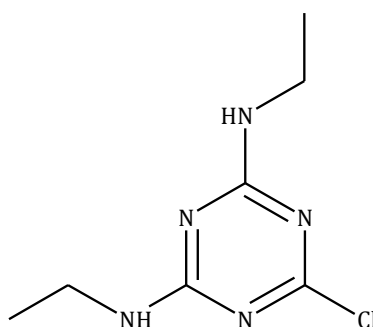


Figura 28. Estructura química de la simazina.

- *Atrazina* ($C_8H_{14}ClN_5$, 6-cloro- N^2 -etil- N^4 -isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina)

Es un herbicida sistémico selectivo, absorbido principalmente a través de las raíces, aunque también a través de las hojas. Se usa para el control pre-y post-emergencia de las hierbas

⁹ Modificación 2004/247/CE del Anexo I de la Directiva Europea 91/414/CEE.

anuales y el forraje en maíz, caña de azúcar, piñas, etc. En Europa su uso se concentra en maizales y trigales aunque también se usa en combinación con otros herbicidas.

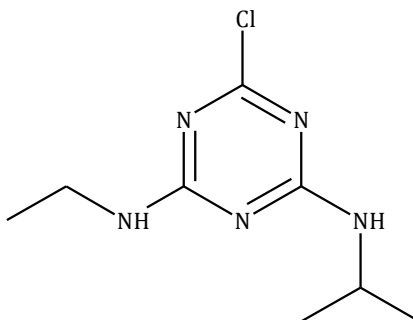


Figura 29. Estructura química de la atrazina.

- *Trietazina* ($C_9H_{16}ClN_5$, 6-chloro- N^2,N^2,N^4 -triethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine)

Es un herbicida usado para el control de malas hierbas en patatas y legumbres principalmente. Es selectivo y se absorbe a través de las raíces y las hojas.

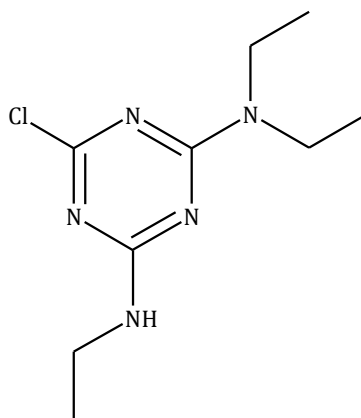


Figura 30. Estructura química de la trietazina.

- *Terbutilazina* ($C_9H_{16}ClN_5$, N^2 -tert-butyl-6-cloro- N^4 -etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina)

Es un herbicida absorbido principalmente por las raíces. Se usa como herbicida de amplio espectro para el control pre- o post-emergencia de malas hierbas en maíz, viñas, cítricos, café, aceitunas, patatas, etc.

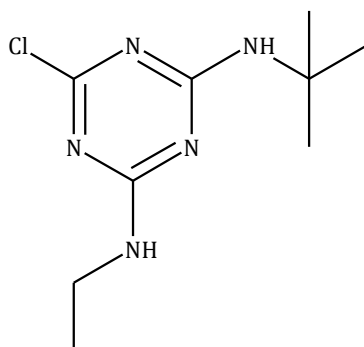


Figura 31. Estructura química de la terbutilazina.

- *Terbutrina* ($C_{10}H_{19}N_5S$, N^2 -tert-butil- N^4 -etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina)

Es un herbicida selectivo que se absorbe por las raíces y las hojas. Se usa como herbicida de pre-emergencia en los cereales de invierno para el control de la hierba de los pastos. También se usa en la caña de azúcar y girasoles ó mezclada con terbutilazina en judías, guisantes y patatas. Se usa como herbicida de post-emergencia en cereales, azúcar de caña y pulverizado directamente en maíz.

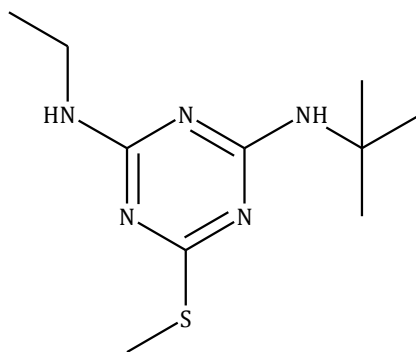


Figura 32. Estructura química de la terbutrina.

d) Ftalimidas

- *Folpet* ($C_9H_4Cl_3NO_2S$, N -(triclorometiltio)ftalimida)

Es un fungicida foliar con acción protectora. Se usa para el control de mohos, enfermedad de manchas foliares, roña, cítricos, viñas, olivos, patatas, lechugas, etc.

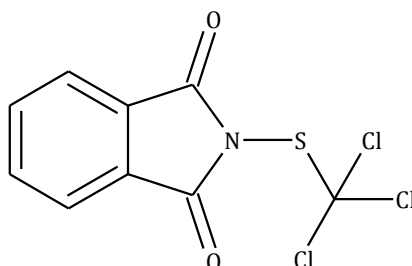


Figura 33. Estructura química del folpet.

- *Captan* ($C_9H_8Cl_3NO_2S$, *N*-(triclorometiltio)ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida)

Igualmente, es un fungicida de acción protectora y curativa y se usa para el control de un amplio intervalo de enfermedades de hongos en diversos cultivos como melocotones, patatas, tomates, cítricos, etc.

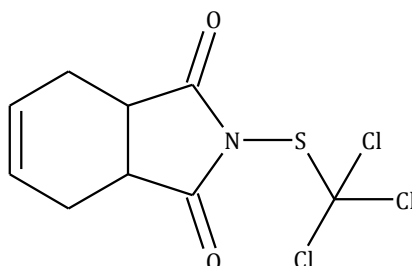


Figura 34. Estructura química del captan.

e) Fenilureas

- *Diuron* ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$, 3-(3,4-diclorofelin)-1,1-dimetilurea)

Es un herbicida sistémico, absorbido principalmente por las raíces. Se usa para el control de la maleza en diversos cultivos como frutales, viñedos, olivar, caña de azúcar, etc.

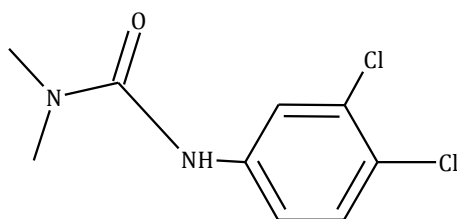


Figura 35. Estructura química del diuron.

f) Feniléteres

- Oxifluorfen ($C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$, 2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-trifluorometilbenzeno)

Es un herbicida selectivo de contacto de pre y post-emergencia usado para el control de malas hierbas y forraje en verduras, frutas, algodón, olivos etc.

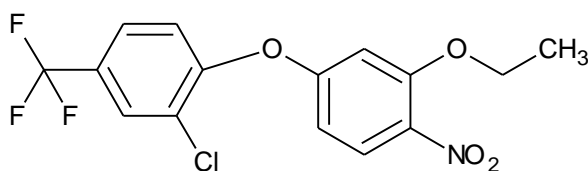


Figura 36. Estructura química del oxifluorfen.

Este herbicida no se había incluido en un principio en el estudio, pero más adelante se optó por ampliar esa lista e incluirlo, ya que empezó a generalizarse su uso como herbicida en el olivar dentro del área geográfica donde se ha desarrollado este estudio. Por esta razón no aparece en el desarrollo de los primeros métodos de análisis de plaguicidas en agua y aceite.

g) Carbamatos

- *Carbaril* ($C_{12}H_{11}NO_2$, 1-naftil metilcarbamato)

Es un insecticida con acción por contacto e ingestión. Se usa en el control de lepidópteros, coleópteros y otros insectos en diferentes cultivos como cítricos, plátanos, fresas, viñas, olivos, ect.

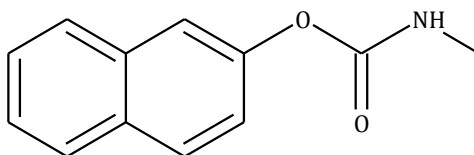


Figura 37. Estructura química del carbaril.

En la siguiente Tabla se muestran las propiedades más relevantes de los plaguicidas estudiados: la solubilidad en agua y coeficiente de partición octanol/agua, $K_{o/w}$ (el cual da una idea de su solubilidad en aceite).

Tabla 2. *Propiedades químicas relevantes de los plaguicidas estudiados.*

Plaguicida	Solubilidad agua mg L ⁻¹ , 25°C	Log K _{ow} 25°C
Diuron	36.4	2.85
alfa HCH	1.9	3.82
Dimetoato	23.3	0.70
Simazina	1.3	2.10
Atrazina	33	2.50
Trietazina	20	3.34
Terbutilazina	8.5	3.21
Diazinon	60	3.30
Lindano	8.5	3.69
Formotion	2600	1.48
Clorpirifos-metil	2.6	4.24
Heptaclor	0.06	5.44
Heptaclor-endo-epóxido	-	-
Heptaclor-exo-epóxido	-	-
Carbaril	120	1.59
Pirimifos-metil	11	4.20
Malatión	145	2.75
Terbutrina	22	3.65
Fenitrotion	14	3.43
Clorpirifos	1.4	4.96
Metidatión	200	2.20
Aldrin	0.03	6.50
Dieldrin	0.14	3.70
Folpet	0.8	3.11
Captan	3.3	2.80
α-Endosulfan	0.32	4.74
β-Endosulfan	0.33	4.79
Endosulfan sulfato	0.48	3.66
Endrin	0.24	3.20
DDT	Inaprediable	6.91
DDD	-	-
Oxifluorfen	0.116	4.86

Dentro de los plaguicidas estudiados también es interesante hacer una distinción entre los que tienen acción foliar (insecticidas y fungicidas) y los que se aplican al suelo directamente (herbicidas).

Tabla 3. División de plaguicidas en estudio en función del tipo de aplicación.

Aplicación foliar		Aplicación en suelo	
Insecticidas	Fungicidas	Herbicidas	
Carbaril	Formotión	Captan	Diuron
Malatión	DDT	Folpet	Simazina
Dimetoato	DDD		Atrazina
Diazinón	Hexaclorociclohexano		Trietazina
Clorpirifos	Aldrín		Terbutilazina
Clorpirifos-metil	Dieldrín		Terbutrina
Pirimifos-metil	Endrín		Oxifluorfen
Metidatión	Heptaclor		
Fenitrotión	Endosulfan		

2.6. Legislación referente a los plaguicidas en estudio

La directiva 91/414 de la Unión Europea¹⁰ y el Codex Alimentarius¹¹ han establecido los límites máximos de residuos de plaguicidas para alimentos y semillas, incluidas las aceitunas. Con respecto a la legislación española, Real Decreto 280/1994¹², tiene por objeto la fijación de los límites máximos de residuos (LMR) de productos fitosanitarios en productos vegetales, así como la instrumentación de su control en relación con el contenido de los mismos. Ha sido modificado posteriormente, por ejemplo, por el Real Decreto 198/2000 del 11 de febrero, por el que se introducen cambios para incorporar la directiva 97/41/CE. Por otro lado, el Real Decreto 390/2003 del 7 de marzo deroga los preceptos del 280/1994 en relación con los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en productos de origen animal y vegetal.

Por otra parte, la Unión Europea también ha establecido los LMR para agua de consumo humano¹³ en la directiva 98/83/EC.

¹⁰ Reglamento de la Comisión Europea No 396/2005 y del Consejo Regulador 91/414/EEC.

¹¹ Comisión del Codex Alimentarius, vol. 2B, 2ª ed., FAO/WHO, Roma, 1996.

¹² Real Decreto 280/1994 del 18 de febrero.

¹³ Directiva 98/83/EC (Official Journal L330, 05/12/1998, p.0032-0045).

Sin embargo, no hay legislación concerniente a los límites máximos de residuos de plaguicidas en aceite de oliva. El Real Decreto 280/1994 establece que en el caso de productos desecados y transformados para los cuales no se hayan fijado límites máximos específicos, se aplicarán los valores definidos para los productos de partida, teniendo en cuenta la concentración o dilución de residuos provocada por el procedimiento de secado o por el tratamiento aplicado, en tanto se establezcan oficialmente los factores de concentración o dilución para las correspondientes operaciones de desecación o transformación.

En el aceite de oliva, puesto que se usan alrededor de 4 kg de aceituna para obtener 1 litro de aceite y dado que la mayoría de los plaguicidas son lipofílicos, cabe esperar una concentración de los residuos en el aceite considerando aproximadamente un factor de 4.

En la Tabla 4 se resumen los LMR de los plaguicidas objeto de estudio en las distintas matrices de interés.

Tabla 4. Límites máximos de residuos (LMR) de los plaguicidas en estudio.

Plaguicida	Límites máximos de residuos		
	Aceituna	Aceite*	Agua**
Diuron	0.20	0.80	0.1
Suma isómeros HCH	0.02	0.08	0.1
Dimetoato	2.00	8.00	0.1
Simazina	0.10	0.40	0.1
Atrazina	0.10	0.40	0.1
Trietazina	0.05	0.20	0.1
Terbutilazina	0.05	0.20	0.1
Diazinon	0.02	0.08	0.1
Lindano	0.01	0.04	0.1
Formotion	0.02	0.08	0.1
Clorpirifos-metil	0.05	0.20	0.1
Heptaclor+epóxido	0.01	0.04	0.1
Carbaril	1.00	4.00	0.1
Pirimifos-metil	0.05	0.20	0.1
Malatión	3.00	1.20	0.1
Terbutrina	0.05	0.20	0.1
Fenitrotion	0.50	2.00	0.1
Clorpirifos	0.05	0.20	0.1
Metidatión	1.00	4.00	0.1
Aldrin+ dieldrin	0.01	0.04	0.1
Folpet+captan	0.10	0.40	0.1
Endosulfan (+End. sulfato)	0.05	0.20	0.1
Endrin	0.01	0.04	0.1
DDD+ DDT	0.05	0.20	0.1
Oxifluorfen	0.05	0.20	0.1

* Este valor es tentativo: LMR = 4 x LMR Aceituna

** La suma de todo no puede exceder 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$

3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En el proceso de análisis de plaguicidas es necesario, en primer lugar, separar los analitos de la matriz y de otras sustancias interferentes. Esta preparación de la muestra engloba, en general, tres etapas: extracción, preconcentración y limpieza (clean-up), aunque en algunos casos es posible realizarlas simultáneamente.

El objetivo de la preparación de la muestra es disponer del analito en el estado más puro posible. Por tanto, la primera etapa es aislar la sustancia a determinar separándola de la matriz¹⁴. Esta etapa es especialmente problemática ya que de ella depende de forma directa el resultado final del análisis. Para ello, la muestra se ha de poner en contacto con un extractante (sólido, líquido o fluido supercrítico) en unas determinadas condiciones, de tal forma que se debiliten completamente las interacciones “analito-matriz”, a la vez que se incrementan las interacciones “analito-extractante”.

3.1 Procedimientos de extracción

Dado el elevado número de técnicas de extracción posibles, a continuación se describen sólo aquellas utilizadas en el desarrollo de esta Memoria.

a) Extracción sólido-líquido

Se basa en la puesta en contacto de una cantidad determinada de muestra sólida con un disolvente adecuado. Para garantizar un contacto íntimo entre muestra y disolvente es fundamental la etapa de homogeneización. Posteriormente, la mezcla es sometida a distintos

¹⁴ C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal, Toma y tratamiento de muestras, Ed. Síntesis, Madrid.

procesos más o menos agresivos en función de la fortaleza de las interacciones analito-matriz. A continuación se describen los procesos utilizados:

- *Agitación mediante ultrasonidos.*

Es un procedimiento de extracción suave que tiene lugar exclusivamente sometiendo a la muestra a la acción del disolvente a través de un proceso de agitación. La aplicación de una onda ultrasónica (25-40 Hz de frecuencia) provoca la contracción y posterior expansión del medio en que se propaga, el disolvente, aumentando la eficacia de los choques entre las moléculas. De esta forma, el disolvente difunde fácilmente en la muestra favoreciéndose el contacto con la misma. Posteriormente, es necesaria una etapa de filtración y evaporación del disolvente.

- *Microondas.*

Los sistemas de extracción con microondas utilizan la radiación electromagnética para calentar el disolvente empleado, el cual extrae los compuestos orgánicos presentes en la muestra sólida. El modo operatorio consiste simplemente en colocar la muestra en un recipiente (abierto o cerrado) junto con el disolvente y someterlo a la radiación de microondas. Una vez finalizada la extracción, el extracto se filtra quedando preparado para posteriores tratamientos. En general, cuanto mayor sea el momento dipolar del disolvente empleado, mayor será su capacidad de extracción. Sin embargo, la solubilidad de la mayoría de los compuestos orgánicos es mayor en los disolventes apolares. Por ello, no es de extrañar que la mayoría de los métodos de extracción con microondas empleen como agente extractante una mezcla de hexano:acetona.

Los equipos comercialmente disponibles en la actualidad permiten un perfecto control de la temperatura, la presión (recipientes cerrados) y la potencia de la radiación empleada, parámetros que lógicamente deberán ser optimizados para cada aplicación.

b) Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido ha sido, y en algunos casos sigue siendo, la técnica más utilizada para la extracción, preconcentración y limpieza de analitos presentes en muestras líquidas. Se basa en la transferencia de un analito desde la muestra a otro disolvente líquido inmiscible con el primero. La muestra se pone en contacto con un disolvente adecuado y después de un período de agitación se separan las fases. Durante este proceso el analito se reparte entre ambos líquidos en función de su solubilidad hasta alcanzar el equilibrio.

Para desarrollar un método de extracción líquido-líquido, y en general cualquier método de extracción de compuestos orgánicos, hay que tener una idea inicial de la polaridad de los analitos objeto de análisis. Existen para gran cantidad de compuestos orgánicos, valores tabulados de los coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}) o de su logaritmo decimal ($\log K_{ow}$ o P_{ow}). Si el valor de K_{ow} es grande, nos indica que el analito tiene tendencia a distribuirse en la fase orgánica y por tanto dará una idea preliminar sobre la metodología a seguir. Generalmente se seleccionan aquellos disolventes orgánicos que tengan una elevada afinidad por los analitos a separar, que sean totalmente inmiscibles con la fase acuosa y que sean relativamente volátiles, para facilitar así la posterior eliminación por evaporación y así preconcentrar el analito.

c) Extracción en fase sólida

El fundamento de la extracción en fase sólida (SPE) es la diferente afinidad que presenta el analito (o matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). Al hacer pasar la muestra a través de una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, etc.), algunos compuestos quedarán retenidos en ella mientras que otros pasarán inalterados. Posteriormente, si los analitos de interés han quedado retenidos, éstos podrán ser eluidos con un pequeño volumen de disolvente. Es una técnica ideal para la extracción de analitos

presentes en muestras líquidas y, por ello, es la que se ha aplicado para la extracción de plaguicidas en agua en la presente memoria.

La forma habitual de trabajo se muestra esquemáticamente en la Figura 38, donde la fase sólida (sorbente) está colocada en un cartucho de vidrio o de polietileno (similar al cuerpo de una jeringuilla).

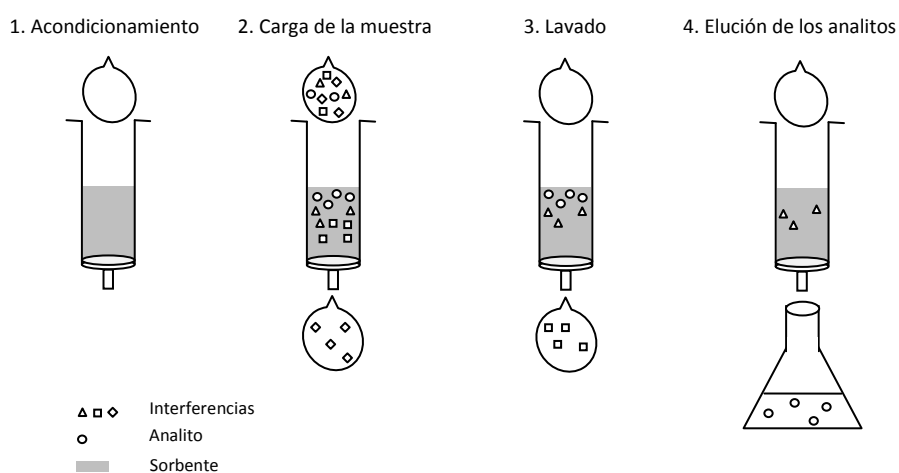


Figura 38. Etapas en la SPE.

En primer lugar el sorbente es acondicionado con un disolvente de propiedades similares a la muestra. Posteriormente, un determinado volumen de muestra se pasa a través de él quedando así los analitos retenidos. Finalmente, después de una etapa de lavado para eliminar posibles compuestos interferentes, los analitos son eluidos con un disolvente adecuado.

La elección del sorbente dependerá del analito, de su nivel de concentración y del disolvente en el que se encuentre. Los tipos de sorbentes empleados más frecuentemente son los siguientes:

- *Sorbentes apolares.*

Es el tipo adecuado para la preconcentración (y limpieza) de compuestos orgánicos presentes en muestras líquidas polares. Los sorbentes más utilizados son las alquil-sílicas (octadecil, C₁₈; octil, C₈; etil, C₂; fenil y ciclohexil).

Cuando la muestra pasa a través de este tipo de sorbentes, los analitos orgánicos interaccionan con la fase ligada (fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas) quedando retenidos en ella. De los adsorbentes mencionados, el más utilizado es el octadecil-sílicas (C₁₈) debido a su capacidad para retener tanto analitos apolares como moderadamente polares. Dicho adsorbente es el que se ha utilizado en el desarrollo de la presente memoria.

- *Sorbentes polares.*

El sorbente más utilizado ha sido la gel de sílice (SiO₂ · H₂O). Los sitios activos de adsorción (polares) son los grupos silanol (Si-O-H) superficiales, los cuales son débilmente ácidos y por tanto interaccionan más fuertemente con analitos básicos. Otros adsorbentes muy comunes son la alúmina (Al₂O₃ · H₂O) y el florisil (coprecipitado de sílice y óxido de magnesio).

En esta metodología, el disolvente compite con los analitos (y/o compuestos interferentes) por los sitios activos de adsorción del adsorbente. Es decir, la elución puede describirse como un desplazamiento del soluto por la acción del disolvente. De esta forma, cuanto más polar es el disolvente, mayor poder de elución presenta.

Dentro de los adsorbentes polares hay que incluir alquil-sílicas con grupos polares como OH, NH₂ y CN, las cuales se obtienen de acuerdo a las reacciones indicadas de modificación de los grupos silanol.

- *Intercambiadores iónicos.*

Este tipo de sorbentes es empleado en la preconcentración de compuestos orgánicos iónicos o al menos fácilmente ionizables. Así, fenoles, ácidos carboxílicos y ftálicos, o herbicidas fenoxiácidos pueden ser fácilmente preconcentrados en intercambiadores aniónicos, mientras que anilinas, aminas y N-heterociclos lo pueden ser en intercambiadores catiónicos.

La preconcentración se realiza a un pH en el que el analito se encuentra totalmente en su forma iónica para así poder interaccionar y ser retenido por el adsorbente. Posteriormente, los analitos son eluidos con un pequeño volumen de una disolución reguladora apropiada a un pH en el que la retención esté totalmente desfavorecida.

3.2 Procedimientos de clean-up

Una vez llevada a cabo la extracción y/o preconcentración del analito, es habitual llevar a cabo un procedimiento de clean-up para la eliminación de posibles especies interferentes. Algunas de estas técnicas son:

- a) Cromatografía en geles permeables (GPC)

La cromatografía de exclusión por tamaños, también denominada cromatografía en geles permeables (GPC) o de filtración en geles es una de las técnicas más empleadas y se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaños están constituidos por pequeñas partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. En los poros, las moléculas son atrapadas efectivamente y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de los

poros del relleno son excluidas y de esta forma, esencialmente no se retienen y, por tanto, son las primeras que eluyen. Las moléculas que tienen diámetros que son significativamente menores que los poros pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas durante más tiempo; éstas son las últimas en eluir. Así tiene lugar el fraccionamiento.

En lo que concierne al tipo de relleno, se emplean fundamentalmente partículas poliméricas y partículas de sílice, ambas con diámetros de partícula que oscilan de 5 a 10 μm . Las partículas de sílice tienen la ventaja de una gran rigidez, lo que facilita el empaquetamiento; y una mayor estabilidad, lo que permite el uso de una gran variedad de disolventes incluyendo el agua. Los inconvenientes son su tendencia a retener solutos por adsorción y su capacidad para catalizar la degradación de las moléculas de soluto.

En un principio, la cromatografía de exclusión por tamaños se llevaba a cabo fundamentalmente utilizando copolímeros de estireno-divinilbenceno entrecruzados. Los geles de estireno-divinilbenceno son hidrofóbicos y, de este modo, sólo pueden utilizarse con fases móviles no acuosas. Sin embargo, en la actualidad se dispone de geles hidrofílicos, que hacen posible el uso de disolventes acuosos para la separación de moléculas grandes solubles en agua como los azúcares.

Dependiendo del tipo de relleno, los métodos de exclusión por tamaños se subdividen en la cromatografía de filtración en gel, que utiliza disolventes acuosos y rellenos hidrofílicos, y la de gel permeable (GPC), que se basa en disolventes no polares y en rellenos hidrofóbicos. El GPC se ha utilizado en el presente estudio como método de clean-up para separar los plaguicidas (bajo peso molecular) de los triglicéridos del aceite (alto peso molecular) en el método de análisis de plaguicidas en aceite y aceituna.

b) SPE

Esta técnica, ya comentada en el punto anterior, es una de las más usadas como clean-up adicional después del proceso de extracción, utilizando adsorbentes como florisil, alúmina, gel de sílice, etc.

4. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Las técnicas cromatográficas son las más empleadas para el análisis de residuos de plaguicidas en diferentes matrices, fundamentalmente la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Dado que es la CG la técnica seleccionada en este trabajo, nos centramos en las características de la misma.

4.1 Instrumentación en CG

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases se muestran en la siguiente figura:

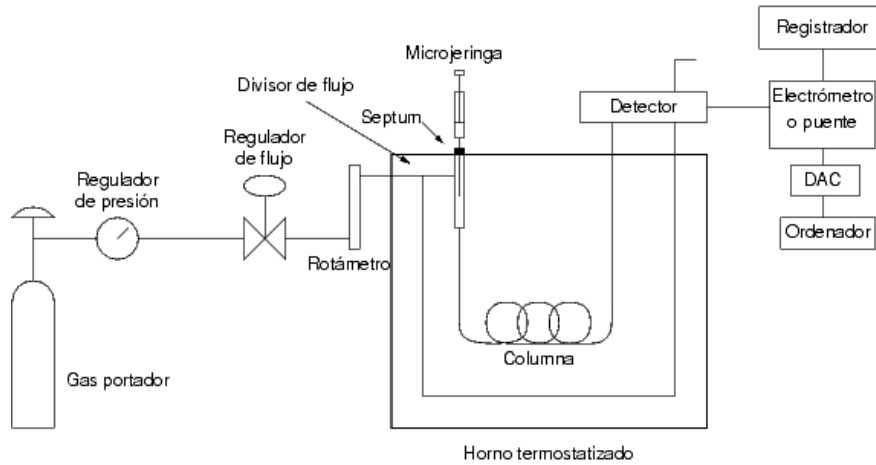


Figura 39. Esquema general del CG.

A continuación se da una breve descripción de cada uno de los componentes:

- Gas portador

Entre los gases portadores, que deben ser químicamente inertes, se encuentran el helio, argón, nitrógeno, dióxido de carbono y el hidrógeno. La elección del gas está con frecuencia determinada por el tipo de detector que se utiliza. Los caudales se controlan normalmente mediante un regulador de presión de dos niveles colocado en la bala del gas, y algún tipo de regulador de presión o regulador de flujo instalado en el cromatógrafo.

- Inyectores y modos de inyección

El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un septum de goma de silicona, en una

cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de columna. La Figura 40 muestra una representación esquemática de un bloque de inyección típico.

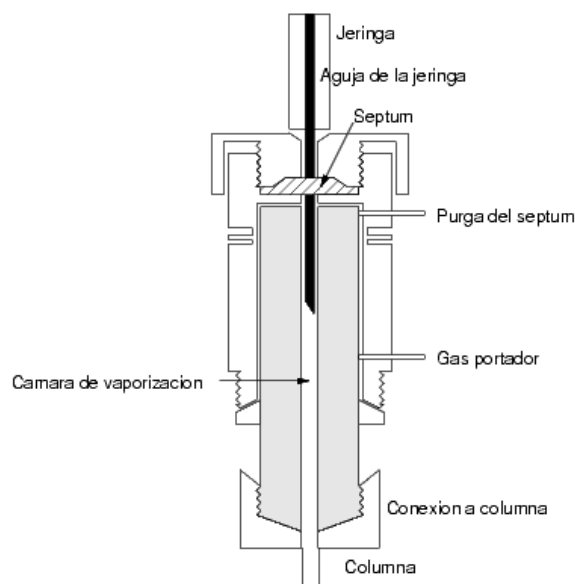


Figura 40. Esquema de un inyector en CG.

Existen dos modos de inyección diferentes: modo *split* (con división de muestra) y en modo *splitless* (sin división de muestra)¹⁵.

Modo de inyección *split*

La muestra se diluye con el gas portador de modo que solo una parte entra en la columna, saliendo el resto por el respiradero de purga. Se utiliza generalmente para analizar componentes mayoritarios de muestras que, por su estado físico, no se pueden diluir antes de la inyección. El divisor de muestra consta de dos válvulas (Figura 41), una lateral que conecta con el inyector y la columna y una superior en la línea del flujo de purga del septum (flujo cuya

¹⁵ M. Ángel Sogorb Sánchez, E. Vilanova Gisbert, Técnicas analíticas de contaminantes químicos, Ed. Díaz de Santos, Madrid 2004.

finalidad es eliminar residuos de descomposición del propio séptum). En la inyección split, la válvula lateral está abierta mientras que la superior está cerrada. En estas condiciones, al inyectar la muestra sólo entra en la columna una parte del total puesto que la mayor parte del flujo total es desviado a través del inyector por la válvula que controla la purga (manteniendo así la presión fijada).

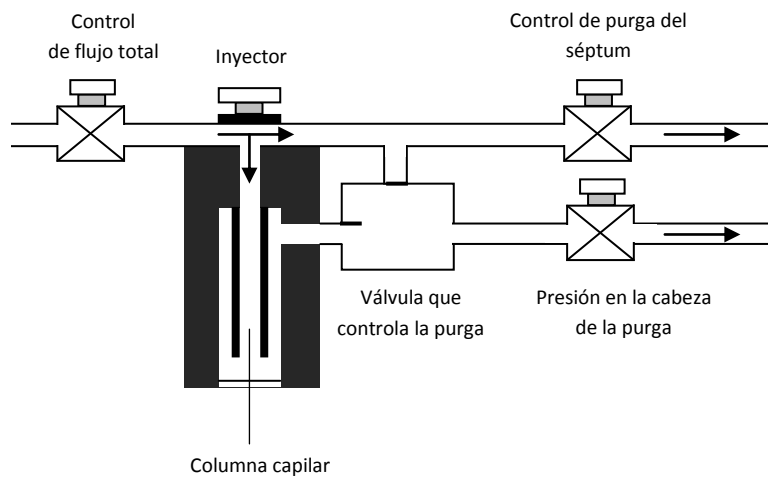


Figura 41. Modo de inyección split (con división).

Modo de inyección splitless

En el modo de inyección splitless la válvula lateral del divisor de la muestra está cerrada durante la inyección (Figura 42), por lo que necesariamente se ha de abrir la válvula superior para permitir mantener la presión en la cabeza de la columna. En esta ocasión, todo el caudal que entra en el puerto de inyección pasa a la columna. A un tiempo determinado, tras la inyección, las válvulas del sistema vuelven a la posición split para evitar la acumulación de vapores.

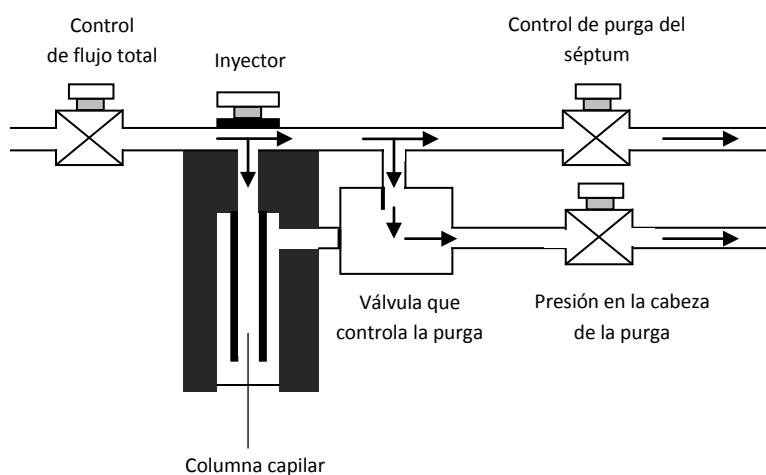


Figura 42. Modo de inyección splitless (sin división).

- Columnas y fases estacionarias

Columnas de relleno

Las columnas de relleno o empaquetadas consisten en unos tubos de vidrio, metal (inerte a ser posible como el acero inoxidable, níquel, cobre o aluminio) o teflón, de longitud de 2 a 3 metros y un diámetro interno de unos pocos milímetros, típicamente de 2 a 4. El interior se

rellena con un material sólido, finamente dividido para tener una máxima superficie de interacción, recubierto con una capa de espesores entre 50 nm y 1 μm .

El material de relleno ideal consiste en pequeñas partículas, esféricas y uniformes, con una buena resistencia mecánica, para tener una máxima superficie donde interaccionar la fase estacionaria y el analito. La superficie específica mínima ha de ser de 1 m^2/g . Como todos los componentes de columnas para CG, debe ser inerte a altas temperaturas ($\sim 400^\circ\text{C}$) y humectarse uniformemente con la fase líquida estacionaria durante el proceso de fabricación. El material preferido actualmente es la tierra de diatomeas natural, debido a su tamaño de poro natural.

Columnas capilares

Las columnas capilares son de dos tipos básicos: las de pared recubierta (WCOT) y las de soporte recubierto (SCOT). Las WCOT son simplemente tubos capilares donde la pared interna se ha recubierto con una finísima capa de fase estacionaria. Las columnas SCOT tienen en su parte interna una fina capa de material adsorbente como el empleado en las columnas de relleno (tierra de diatomeas) donde se ha adherido la fase estacionaria.

Las columnas WCOT se fabrican a partir de sílice fundida, conocidas como columnas tubulares abiertas de sílice fundida o FSOT. Estas columnas se fabrican a partir de sílice especialmente pura, sin apenas contenido de óxidos metálicos. Debido a la fragilidad inherente a este material, en el mismo proceso de obtención del tubo se recubre con una capa de poliimida, de esta forma la columna puede enrollarse con un diámetro de unos pocos centímetros. Estas columnas, con propiedades como baja reactividad, resistencia física y flexibilidad, han sustituido a las WCOT clásicas.

En una columna de CG las propiedades deseables para una fase estacionaria líquida inmovilizada incluyen: (1) baja volatilidad; (2) estabilidad térmica; (3) inercia química. Generalmente, la polaridad de la fase estacionaria debe ser mayor ó parecida a la de los componentes de la muestra. Cuando la igualdad es buena, el orden de elución viene determinado por el punto de ebullición de los analitos.

Algunas fases estacionarias utilizadas actualmente son:

- ✓ Polidimetilsiloxano, fase no polar de uso general para hidrocarburos, aromáticos, polinucleares, drogas, esteroides y PCBs.
- ✓ Poli(fenilmetildifenil)siloxano (10% fenilo), para ésteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides, drogas y compuestos halogenados.
- ✓ Poli(fenilmetil)siloxano (50% fenilo), para drogas, esteroides, plaguicidas y glicoles.
- ✓ Poli(trifluoropropildimetil)siloxano, para aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituidos.
- ✓ Polietilenglicol, sirve para compuestos polares, también para compuestos como glicoles, alcoholes, éteres, aceites esenciales.
- ✓ Poli(dicianoalildimetil)siloxano, para ácidos grasos poliinsaturados, ácidos libres y alcoholes.

Generalmente, en columnas comerciales, la fase estacionaria se presenta enlazada y entrecruzada para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado. De esta forma se obtiene una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna. La reacción implicada suele ser la adición de un peróxido al líquido a fijar, iniciándose una reacción por radicales libres que tiene como resultado la formación de un enlace carbono-carbono que además incrementa su estabilidad térmica. Otra forma es la irradiación con rayos gamma.

- Detectores

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Entre ellos nos podemos encontrar con:

- ✓ Detector de ionización de llama (FID, detector de ionización de llama).
- ✓ Detector de conductividad térmica (TCD, detector de conductividad térmica).
- ✓ Detector termoiónico (TSD, detector termoiónico específico).
- ✓ Detector de captura de electrones (ECD, detector de captura electrónica).

- ✓ Detector de emisión atómica (AED, detector de emisión atómica).
- ✓ Espectrometría de masas (MS).

A continuación se describirán brevemente sólo aquellos detectores utilizados en el desarrollo de esta memoria: TSD, ECD y MS. La espectrometría de masas, dado su carácter más complejo, se estudiará en el siguiente apartado (0).

- ✓ Detector termoiónico, TSD

Es un detector selectivo para compuestos orgánicos fosforados y nitrogenados, aunque su respuesta no es igual para ambos elementos, siendo para el fósforo 10 veces mayor que para el nitrógeno. Es unas 500 veces más sensible que el detector de ionización de llama para compuestos fosforados y unas 50 veces más sensible para compuestos nitrogenados (típicamente aminas, nitratos y otras especies). Debido a esta sensibilidad obtenida con compuestos fosforados, su uso es amplio en la determinación de plaguicidas fosforados.

El principio de funcionamiento es el siguiente (Figura 43): el gas de salida de la columna se mezcla con hidrógeno y se quema. Este gas pasa alrededor de una esfera de rubidio calentada eléctricamente hasta unos 600-800°C, y mantenida a un potencial de 180 V respecto al colector, alrededor de la cual se forma un plasma. Mediante un mecanismo no muy bien establecido, se forma una gran cantidad de iones a partir de las moléculas fosforadas y nitrogenadas, y al tener un medio conductor dicha diferencia de potencial permite la aparición de una pequeña corriente eléctrica amplificable y medible. Por lo general, la intensidad de la corriente será proporcional al número de iones formados, y por tanto a la cantidad de analito.

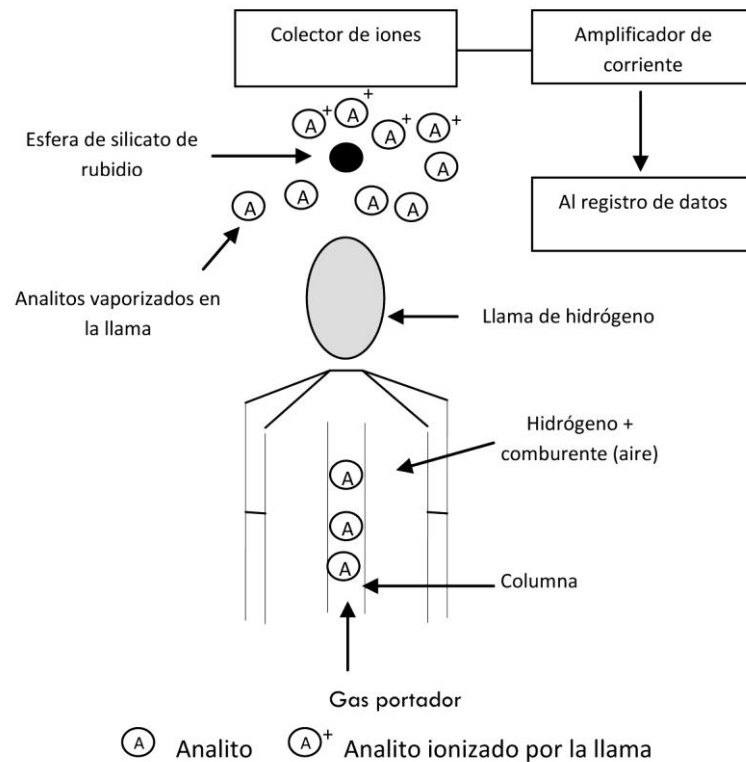


Figura 43. Diagrama operacional del TSD.

- ✓ Detector de captura electrónica, ECD

Su funcionamiento básico se basa en la emisión de una partícula β (electrón) por parte de átomos como el ^{63}Ni o tritio adsorbido sobre una placa de platino o titanio (Figura 44). Dicho electrón ioniza el gas portador y se produce una ráfaga de electrones. Si se aplica un campo eléctrico constante, mediante un par de electrodos, por ejemplo, se tendrá una corriente constante entre ambos. Sin embargo, si se tienen especies orgánicas en el gas, éstas

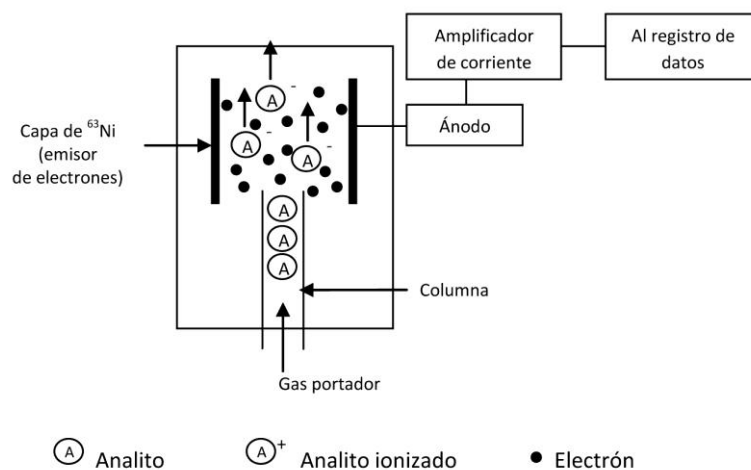


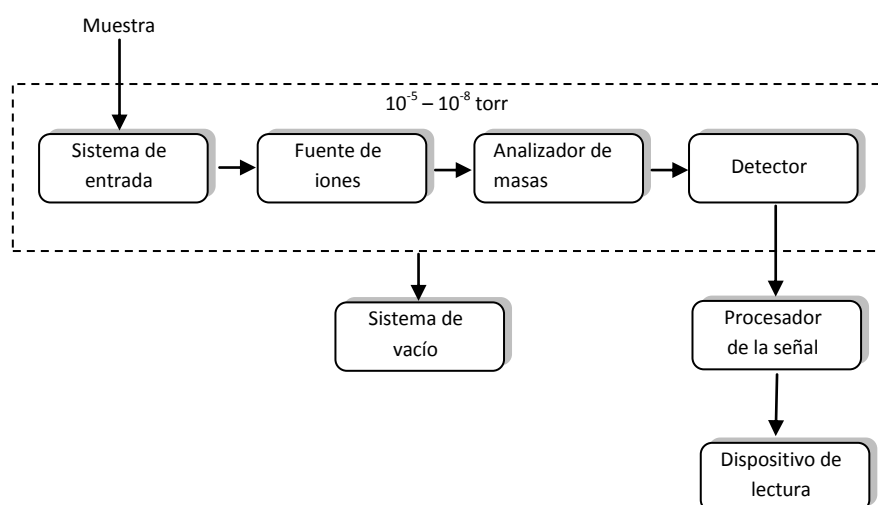
Figura 44. Diagrama operacional del ECD.

Este detector es muy selectivo, y es sensible a la presencia de moléculas con grupos electronegativos como quinonas y grupos nitro, grupos que contienen átomos de halógeno (cloro, bromo, yodo), oxígeno y nitrógeno. Otros grupos como el alcohol, amina e hidrocarburos no dan señal.

Se aplica en la detección de moléculas que contienen halógenos, principalmente cloro, como algunos insecticidas o PCBs.

4.2 Espectrometría de masas (MS)

Esta técnica de detección es la herramienta más potente de la que se dispone en esta última década. El espectrómetro de masas deberá estar acoplado adecuadamente al CG. Los espectros de masas se obtienen por conversión de los componentes de la muestra, previamente separados en el CG, en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se distribuyen en función de su relación masa-carga. El siguiente diagrama muestra los componentes principales de un espectrómetro de masas:



A continuación se describen brevemente las partes más relevantes del espectrómetro de masas:

- Fuentes de ionización

La fuente de ionización es la zona del espectrómetro de masas donde las moléculas de analito se ionizan para posteriormente pasar al detector. Los principales modos de ionización en CG-MS son:

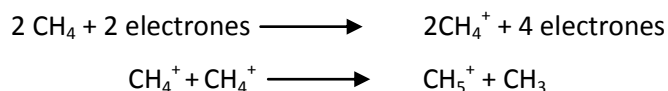
- Impacto electrónico (EI)

En la cámara de ionización, un filamento de tungsteno o renio emite electrones que son acelerados. Las moléculas gaseosas de muestra se introducen en el haz de electrones y son ionizadas por impactos con los electrones. Un repelente de iones (que debe estar cargado con la misma carga que los iones a detectar) produce un campo eléctrico dentro de la cámara tal que los iones producidos abandonan la cámara por repulsión electrostática, siendo focalizados hacia el analizador. Dependiendo de la estructura original del compuesto y del exceso de

energía desestabilizadora (interna) presente en la estructura, el compuesto ionizado (ion molecular) se fragmenta. Este proceso forma fragmentos ionizados y neutros. Este conjunto de iones, característicos de la molécula de la muestra, forma el espectro de masas.

- Ionización química (CI)

La generación de iones mediante la técnica de ionización química se basa en la interacción de los analitos con una especie química ionizante. Uno de los reactivos ionizantes más empleados en CI es el metano (CH_4). La reacción se inicia con la generación del ión CH_4^+ por los impactos que se dan entre los electrones que emite el filamento y las moléculas de metano neutras conforme a las siguientes reacciones:



Si el analito (A) que entra en la cámara de ionización tiene una gran afinidad por protones se puede dar la reacción:



Siendo AH^+ el ion detectado

La CI es una técnica de ionización más suave que el EI. Así pues, las moléculas ionizadas de la muestra sufren menos fragmentación y se puede observar más fácilmente un ion indicativo de la masa molecular. Además, los espectros de masas de CI proporcionan otra información estructural significativa que puede que no proporcione un espectro de masa EI.

- Analizadores

El analizador es la parte del espectrómetro de masas encargada de determinar cuál es la m/z responsable de los iones que llegan al detector. A continuación se describen los tipos de analizadores más comunes.

- *Analizador de sector magnético*

Estos analizadores utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz de iones de la fuente se mueva en una trayectoria circular de 180, 90 o 60 grados. Los iones son acelerados hacia el tubo analizador metálico, que se mantiene a una presión interna de unos 10^{-7} torr. Se puede llevar a cabo un barrido de los iones de diferente masa a través de la rendija de salida variando la fuerza del campo del imán o el potencial de aceleración. Los iones que pasan a través de la rendija de salida se recogen en un electrodo colector y dan lugar a una corriente de iones que es amplificada y registrada.

- *Analizador de cuadrupolo*

Un cuadrupolo es un filtro que en unas determinadas condiciones de operación transmite sólo iones de un pequeño intervalo de relaciones m/z . Todos los otros iones son neutralizados y eliminados como moléculas sin carga. Variando las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores m/z transmitidos haciendo así posible el barrido espectral.

La siguiente Figura muestra un diagrama simplificado de un espectrómetro de masas de cuadrupolo:

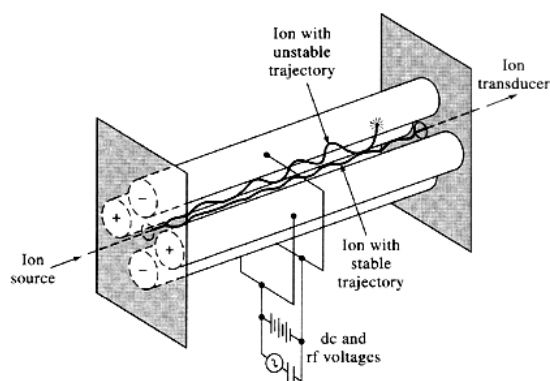


Figura 45. Diagrama de un espectrómetro de masas de cuadrupolo.

La parte más importante del instrumento es el conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal que sirven de electrodos del filtro de masas. Los iones de la fuente son acelerados e introducidos en el espacio entre las barras. Mientras, los voltajes de las barras se van aumentando simultáneamente. En un momento determinado, todos los iones excepto aquellos que tienen una cierta relación m/z son despedidos del espacio entre las barras y se convierten en moléculas neutras. Así pues, sólo los iones que tienen un intervalo determinado de relación m/z llegan al detector. Normalmente, los analizadores cuadrupolo diferencian fácilmente iones que difieren en una unidad de masa.

- *Analizadores de tiempo de vuelo*

En estos analizadores¹⁶, los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Los iones producidos de esta manera son acelerados por un impulso de campo eléctrico que tiene la misma frecuencia, pero retrasada, que el impulso de ionización. Las partículas aceleradas pasan entonces a un tubo analizador de un metro de longitud sobre el que no actúa ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma

¹⁶ W.N. Delgass, R.G. Cooks, *Science* 235 (1987) 545.

energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto, las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas.

- *Analizador de trampa de iones*

Se han desarrollado varios tipos de trampas de iones¹⁷, y son dos las utilizadas normalmente en los espectrómetros de masas comerciales. Una de ellas es la trampa de resonancia de ión ciclotrón y la otra una trampa de iones sencilla y que es la que se ha utilizado como analizador en el CG-MS empleado para el desarrollo de esta memoria. Por esta razón, haremos mayor hincapié en esta última. En la Figura 46 se muestra la sección longitudinal de la misma.

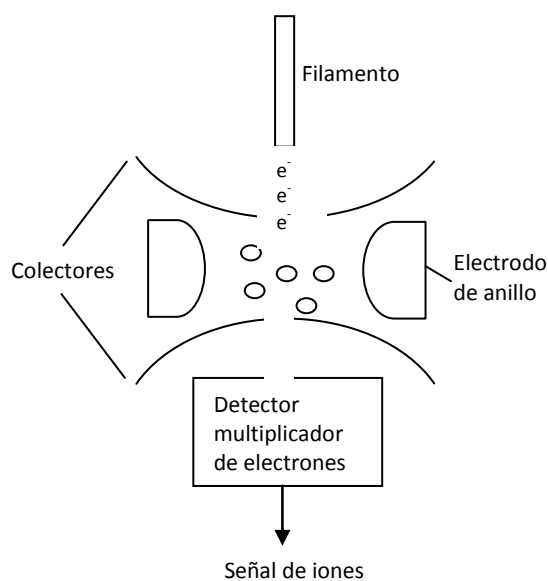


Figura 46. Sección longitudinal de una de trampa de iones.

¹⁷ J. Allison, R.M. Stepnowski, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1072.

Consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra. Los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrómetro de masas una ráfaga de iones del analito procedentes de una fuente de impacto de electrones o de ionización química se introduce a través de una rejilla en el colector superior. Entonces, se hace el barrido del potencial de radiofrecuencia y los iones son atrapados; cuando se desestabilizan, dejan la cavidad del electrodo de anillo a través de una abertura en el colector inferior. Los iones emitidos pasan entonces al detector.

Los espectrómetros de trampa de iones son robustos, compactos y más económicos que los instrumentos de sector magnético o de cuadrupolo. Una versión comercial corriente de este dispositivo se ilustra en la siguiente figura¹⁸:

¹⁸ G.C. Stafford Jr, P.E. Kelley, D.C. Bradford, *Amer. Lab.* 15 (1983) 51.

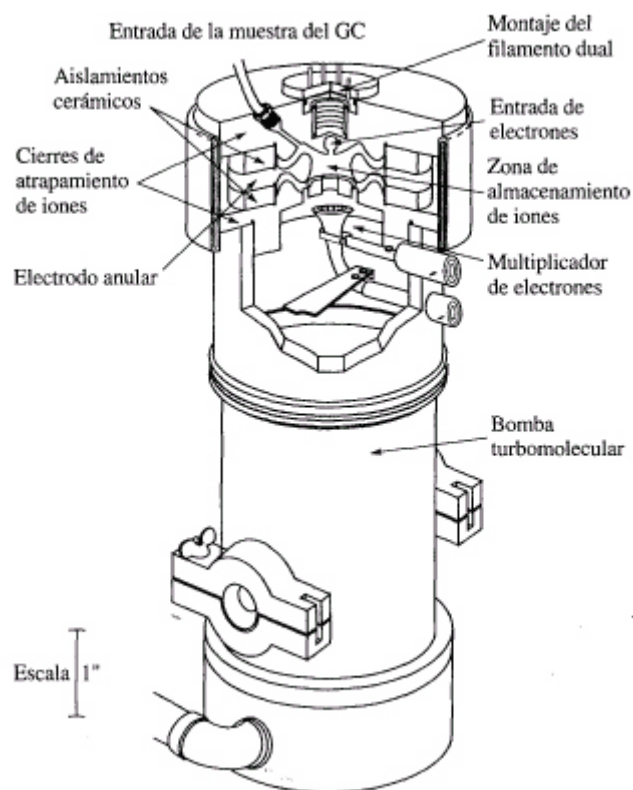


Figura 47. Esquema del analizador de trampa de iones.

Este tipo de analizador se diferencia de los analizadores que transportan los haces como los de sector magnético, cuadrupolos y TOF, donde los iones a separar pasan a través de una secuencia de campos electromagnéticos fijos. En lugar de eso, la trampa de iones confina los iones dentro de una misma región donde se les aplican campos electromagnéticos dependientes del tiempo.

- Modos de detección en MS

Los espectrómetros de masas pueden operar en modo *barrido* (scan) o en modo de monitorización de un ion seleccionado, *selected ion monitoring* (SIM). Asimismo, otra alternativa es trabajar con la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), la cual permite

una mayor resolución espectral y ha sido por ello el modo preferido de trabajo para el desarrollo de esta memoria. A continuación se comentan brevemente cada una de ellas:

- Modo Scan

En este modo los instrumentos detectan todas las señales en un intervalo de m/z dado.

- Modo SIM

En este modo, los instrumentos monitorizan sólo unas pocas m/z . Como consecuencia, el analizador es capaz de estar mucho más tiempo haciendo un muestreo de cada uno de los valores m/z seleccionados y esto se traduce en un gran incremento de reproducibilidad de la señal y se puede reducir significativamente el ruido de fondo inespecífico.

- Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

La espectrometría de masas en tándem consiste en aislar un ion precursor (eliminando los iones que no interesan) proveniente de una primera fragmentación para someterlo a una segunda fragmentación. El hecho de eliminar los iones que no interesan, enriquece los iones de la muestra comparado con los iones procedentes de la matriz y esto hace que la sensibilidad sea de estos instrumentos sea bastante alta.

El modo de operar clásico de un sistema MS/MS se muestra en la siguiente Figura:

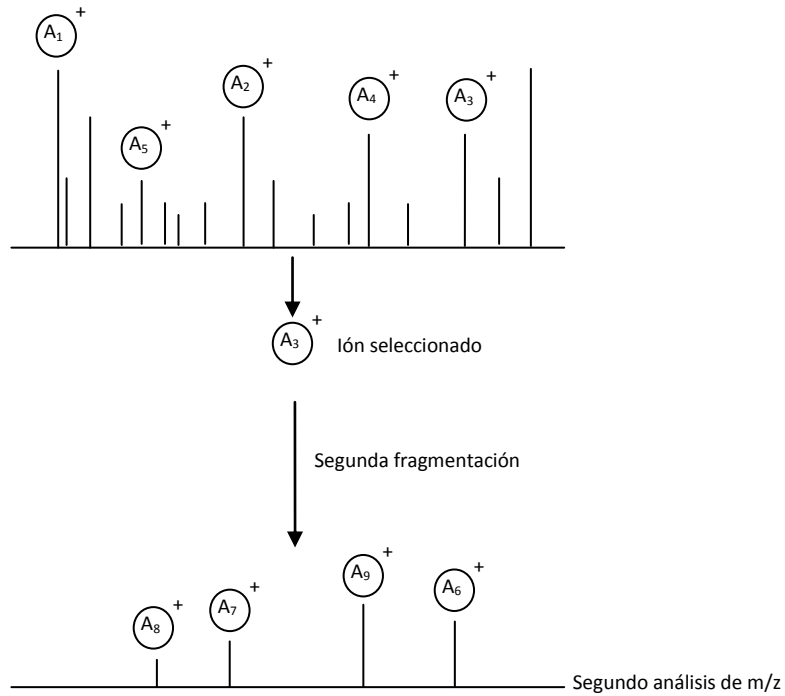


Figura 48. Funcionamiento de un sistema MS/MS.

La utilidad de la técnica MS/MS deriva de lo siguiente:

- obtención información estructural cualitativa de la muestra mediante la formación del espectro del ion producto.
- aumento de la relación S/N mediante la eliminación de los iones interferentes de la matriz en el espectro del ion producto durante el aislamiento.

III. Objetivos

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

El objetivo general de la presente memoria es disponer de métodos de análisis fiables que posibiliten la determinación de residuos de plaguicidas en aceite y aceituna, así como estudiar la influencia de las etapas preliminares del proceso de obtención del aceite sobre los niveles de estos plaguicidas, incidiendo especialmente en el lavado de la aceituna. Para ello, será necesario igualmente desarrollar métodos de análisis para las aguas de lavado de la aceituna así como de los lodos de las lavadoras.

Además, debido a la escasez de agua en nuestro entorno, las almazaras reutilizan estas aguas de lavado, incorporando en algunos casos (muy pocos) algún tipo de proceso de depuración. Por ello también se pretende proponer mejoras de los tratamientos físico-químicos para la reutilización de las mismas. Hasta al momento, no existen estudios que revelen la influencia que el lavado de la aceituna a escala de almazara tiene sobre la presencia de residuos de productos fitosanitarios.

B. Objetivos específicos

- 1) Desarrollar y validar métodos de análisis de plaguicidas en aceituna, aceite, aguas y lodos procedentes de lavadoras de aceituna mediante CG-MS/MS y CG-ECD/TSD.
- 2) Comprobar la influencia del método de recolección de aceitunas y de la separación o no separación del fruto en función del mismo, sobre la presencia de residuos de plaguicidas en aceitunas y en aceite de oliva.

- 3) Estudiar la evolución de la contaminación del agua de lavado de aceitunas con residuos de plaguicidas en las almazaras a medida que avanza el ciclo de lavado y evaluar su efecto sobre la eficiencia del proceso de lavado.
- 4) Estudiar, a escala de laboratorio, modificaciones que mejoren los tratamientos físico-químicos con vistas a la reutilización de las aguas de lavado de aceitunas.

IV. Antecedentes

III. ANTECEDENTES

1. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

La necesidad de analizar los productos vegetales en busca de residuos de productos fitosanitarios empleados para proteger a la planta del ataque de plagas y enfermedades, así como, para la eliminación de malas hierbas, ha llevado a desarrollar métodos de análisis de dichos compuestos. Como puede observarse en el siguiente gráfico, el análisis de plaguicidas viene siendo objeto de gran interés en los últimos años (Fuente: SciFinder Scholar™):

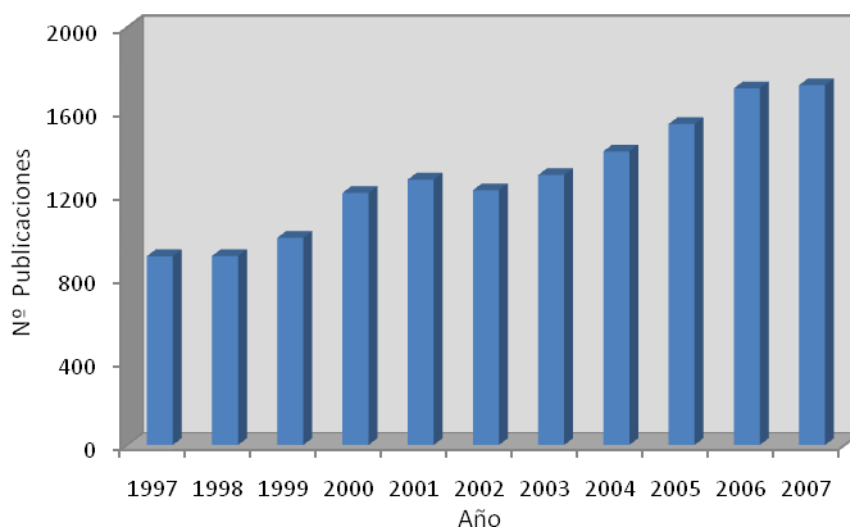


Figura 49. Publicaciones referentes de análisis de plaguicidas en los últimos años.

De la misma manera, es creciente la preocupación por la presencia de residuos de plaguicidas en aceites, lo que ha impulsado el desarrollo de métodos fiables de análisis, tal y como se refleja en la Figura 50.

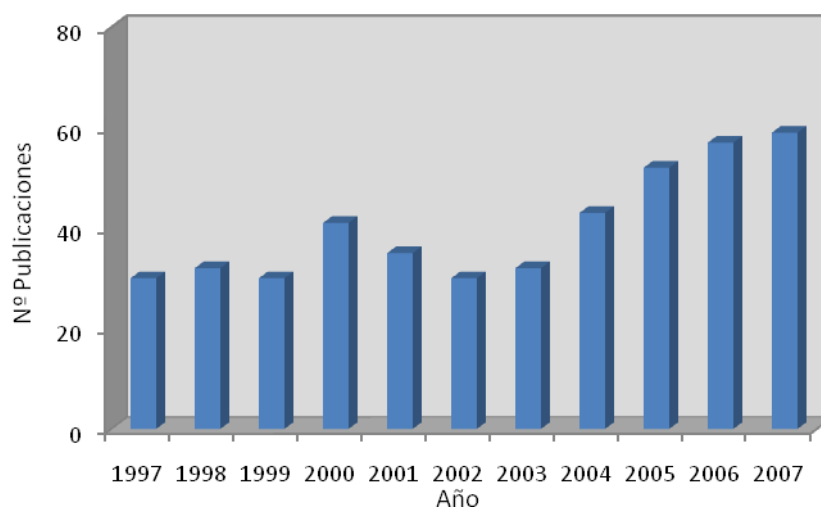


Figura 50. Publicaciones de análisis de plaguicidas en aceites en los últimos años

Debido a la amplia variedad de plaguicidas disponibles, sus diferentes características complican la determinación a nivel de trazas del intervalo completo de estos compuestos. A causa de esto, se hacen necesarias técnicas que combinen tiempos de análisis reducidos, selectividad y una adecuada sensibilidad. Es por ello que, tal y como se muestra en la Figura 51, el método preferido para la determinación de plaguicidas volátiles es la CG y es el elegido en el desarrollo de esta memoria debido a su elevada eficiencia de separación y la variedad de métodos de detección que pueden usarse.

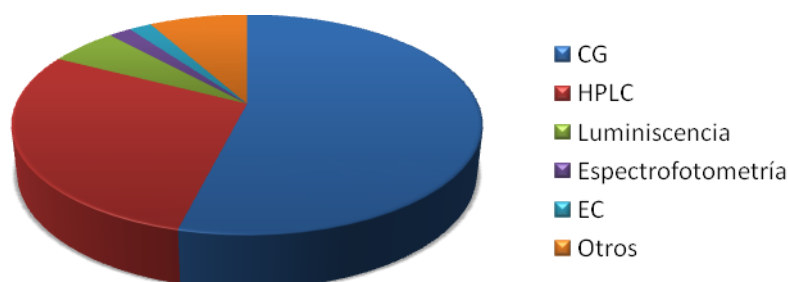


Figura 51. Métodos de análisis utilizados en la determinación de residuos de plaguicidas.

1.1 Principales sistemas de detección

Tres de los modos de detección más utilizados en CG son el detector de nitrógeno-fósforo (NPD), también llamado detector termoiónico específico (TSD), para los compuestos que contienen nitrógeno o fósforo^{19,20,21,22,23,24}, el detector de ionización de llama (FID)^{25,26,27,28} y el detector de emisión atómica (AED)^{29,30,31,32}.

¹⁹ X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, O. Suzuki, *Chromatographia* 42 (1996) 135.

²⁰ Ch. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, F. Cherasco, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 135.

²¹ T.L. Potter, L. Marti, S. Belflower, C.C. Truman, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4103.

²² H. Sabik, R. Jeannot, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 73.

²³ C. López-Blanco, S. Gómez-Álvarez, M. Rey-Garrote, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1002.

²⁴ J. Dugay, C. Miège, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 27.

²⁵ E. Ballesteros, M.J. Parrado, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 267.

²⁶ Y. Zi-wei, J. Gui-bin, L. Jie-min, C. Wei, *Talanta* 55 (2001) 807.

²⁷ D.A. Lambropoulou, V.A. Sakkas, D.G. Hela, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 107.

²⁸ M.T. Sng, F.K. Lee, H.A. Lakso, *J. Chromatogr. A* 759 (1997) 225.

²⁹ J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín, J.J. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 245.

³⁰ M. Yu. Vozhdaeva, L.G. Tsypysheva, L.I. Kantor, E.A. Kantor, *J. Anal. Chem.* 62 (2007) 1069.

³¹ P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, N. Aguinada, M. Hernández-Córdoba, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3704.

³² N. Campillo, R. Peñalver, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 71 (2007) 1417.

Por otra parte, el detector de captura electrónica (ECD) también ha sido ampliamente utilizado para la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados debido a su elevada sensibilidad y selectividad^{33,34,35,36,37,38,39}. Sin embargo, los problemas asociados con el análisis de plaguicidas en matrices complejas son bien conocidos y las interferencias debidas a coelución de compuestos de la matriz que acompaña a los analitos pueden ser importantes. En este sentido, los detectores que se han mencionado anteriormente no proporcionan una confirmación inequívoca de la identidad del compuesto detectado. Para ello, la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, CG-MS, es la técnica analítica preferida para la confirmación de residuos de plaguicidas. Generalmente se disponen de dos modos de operación en CG-MS: impacto electrónico (EI)⁴⁰ e ionización química (CI)⁴¹. La CG-MS en el modo CI es utilizada normalmente para la determinación de plaguicidas en matrices poco complejas; dependiendo del compuesto en concreto, puede ofrecer mejor selectividad y/o sensibilidad que el EI. Para aumentar la sensibilidad se escoge el modo SIM (Selected Ion Monitorization)^{42,43,44,45,46,47} aunque la confianza en la confirmación de la identidad se puede ver reducida si uno o más de los iones seleccionados están afectados por interferencias de matriz, resultando en una información espectral pobre. Alternativamente, el uso del tándem

³³ J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, L. Toribio, A.L. Mayorga, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 373.

³⁴ M.C. López-Blanco, B. Reboreda-Rodríguez, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 293.

³⁵ O.S. Fatoki, R.O. Awofolu, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 225.

³⁶ B.A. Tomkins, A.R. Barnard, *J. Chromatogr. A* 964 (2002) 21.

³⁷ R. Boussahel, S. Bouland, K.M. Moussaoui, V. Baudu, A. Montiel, *Water Res.* 36 (2002) 1909.

³⁸ Y. Hai Lang, X. Mei Cao, X. Jiang, *Talanta* 66 (2005) 249.

³⁹ P. Manirakiza, A. Covaci, S. Andries, P. Schepens, *J. Environ. Anal. Chem.* 81 (2001) 25.

⁴⁰ G.L. Hook, G.L. Kimm, T. Hall, P.A. Smith, *Trends in Anal. Chem.* 21 (2002) 534.

⁴¹ E. Jover, J.M. Bayona, *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 213.

⁴² S. Barrek, O. Paise, M.F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 355.

⁴³ P.D. Johnson, D.A. Rimmer, R.H. Brown, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 3.

⁴⁴ G. Niessner, W. Buchberger, R. Eckerstorfer, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 341.

⁴⁵ T. Kusakabe, T. Saito, S. Takeichi, *J. Chromatogr. A* 761 (2001) 93.

⁴⁶ S. Wang, P. Zaho, G. Min, G. Fang, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 166.

⁴⁷ C.C. Leandro, D.A. Bishop, R.J. Fussell, F.D. Smith, B.J. Keely, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 645.

MS/MS con trampa de iones^{48,49,50,51,52,53,54}, o más recientemente, con triple cuadrupolo^{55,56,57,58} incrementa significativamente la sensibilidad y la selectividad. Hoy en día, la CG-MS/MS es una técnica analítica ideal para la confirmación de las identidades de los residuos de plaguicidas y evitar así falsos positivos. La utilidad de la técnica MS/MS deriva de lo siguiente:

- i. El llenado de la trampa de iones con el ion característico seleccionado para cada plaguicida.
- ii. La obtención de información estructural cualitativa de la muestra mediante la formación del espectro del ion producto.
- iii. El aumento de la relación señal/ruido (S/N), por la eliminación de los iones interferentes de la matriz en el espectro del ion producto durante el aislamiento.

1.2 Métodos de extracción y clean-up

La preparación de las muestras para la determinación de residuos de plaguicidas por GC requiere la eliminación de la mayor parte posible de matriz donde se encuentran estos analitos. Estos procedimientos consisten en la extracción de los analitos desde la matriz a un

⁴⁸ J.L. Martínez Vidal, M.C. Pablos Espada, A. Garrido Frenich, F.J. Arrebola, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 235.

⁴⁹ M.C. Pablos Espada, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, P. Parrilla, *Anal. Lett.* 34 (2001) 597

⁵⁰ A. Garrido Frenich, M.C. Pablos Espada, J.L. Martínez Vidal, L. Molina, *J. AOAC. Int.* 84 (2001) 1751.

⁵¹ N. Sauret-Szczepanski, P. Mirabel, H. Wortham, *Environ. Poll.* 139 (2006) 133.

⁵² R. Serrano, M. barreda, E. Pitarch, E. Hernández, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 75.

⁵³ F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Chromatogr. Sci.* 39 (2001) 177.

⁵⁴ C. Campoy, M. Jiménez, M.F. Olea-Serrano, M. Moreno Frias, F. Cañabate, N. Olea, R. Bayés, J.A. Molina-Font, *Early Human Developm.* 65 (2001) S183.

⁵⁵ K. Patel, R.J. fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, G.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 289.

⁵⁶ D.G. Hayward, K. Hooper, D. Andrzejewski, *Anal. Chem.* 71 (1999) 212.

⁵⁷ J.L. Martínez Vidal, F.J. Arrebola Liébanas, M.J. González Rodríguez, A. Garrido Frenich, J.L. Fernández Moreno, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 365.

⁵⁸ A. Garrido Frenich, M.J. González Rodríguez, F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4640.

disolvente apropiado. Si es necesario, se procede a la eliminación de las sustancias potencialmente interferentes presentes en el extracto mediante la aplicación de metodologías de clean-up para después concentrar los extractos hasta pequeños volúmenes antes del análisis.

Los métodos de preparación de muestra aplicados dependen de la naturaleza de la matriz en concreto en que se quiera llevar a cabo la determinación de residuos de plaguicidas. En esta memoria se trabaja con cuatro tipos de matrices: agua, suelo/lodos, aceite y aceituna. A continuación se describen los principales tratamientos de muestras que se han aplicado hasta la fecha para cada una de estas matrices.

1.2.1 Agua

La técnica clásica para la extracción de plaguicidas de agua ha sido la extracción líquido-líquido (LLE)^{59,60}, aunque presenta desventajas como lentitud en el procesamiento de las muestras y el consumo de grandes cantidades de disolventes para obtener una extracción eficiente. En este sentido, se han obtenido mejoras sustanciales con el uso de nuevas metodologías como:

- i. Microextracción en fase sólida (SPME). Combina la toma de muestra y la preconcentración en un solo paso y no se necesita un método de clean-up adicional antes del análisis mediante CG^{61,62,63,64}.

⁵⁹ M.J. Fernández, C. García, R.J. García-Villanova, J.A. Gómez, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1790.

⁶⁰ K.A. Krock, C.L. Wilkins, *J. Chromatogr. A* 726 (1996) 167.

⁶¹ C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 177.

⁶² J.L. Pérez-Trujillo, S. Frías, J.E. Conde, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 95.

⁶³ B.A. Tomkins, R.H. Ilgner, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 183.

⁶⁴ M. Sakamoto, T. Tsutsumi, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 63.

- ii. Microextracción sobre una sola gota (SDME). Proporciona una extracción del analito en una sola gota de disolvente orgánico^{65,66,67}.
- iii. Extracción en fase sólida (SPE). Se basa en el uso de adsorbentes de sílice entrelazada, la cual implica una disminución en el tiempo de análisis, un menor costo y una disminución drástica en el consumo de disolventes orgánicos^{68,69,70,71}. En la presente memoria se ha seleccionado este método para la extracción de residuos de plaguicidas en agua debido a las ventajas anteriormente mencionadas.

1.2.2 Suelo/lodos

La técnica clásica utilizada en la determinación de residuos de herbicidas en muestras de suelo ha sido la partición sólido-líquido con disolventes orgánicos usando agitación mecánica^{72,73} o extracción mediante Soxhlet^{74,75,76}. Las desventajas de estos métodos tradicionales de extracción son el uso de grandes cantidades de disolventes, material y el gran consumo de tiempo (entre 8 y 36 horas en el caso de la extracción por Soxhlet). Estos inconvenientes se han podido reducir usando otras técnicas desarrolladas recientemente. La extracción con

⁶⁵ M. Palit, D. Pardasani, A.K. Gupta, D.K. Dubey, *Anal. Chem.* 77 (2005) 711.

⁶⁶ M.C. López-Blanco, S. Blanco-Cid, B. Chancho-Grande, J. Simal-Gándara, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 245.

⁶⁷ X. Li, X. Xu, X. Wang, L. Ma, *J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 633.

⁶⁸ R. Sasano, T. Hamada, M. Kurano, M. Furuno, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 41.

⁶⁹ H. Sabik, B. Rondeau, P. Gagnon, R. Jeannot, K. Dohrendorf, *J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 457.

⁷⁰ El-Kabbany, S. Rashed, M.M. Zayed, *J. Haz. Mat.* 72 (2000) 11.

⁷¹ M. Gerard, J.P. Barthelemy, A. Copin, *J. Environ. Anal. Chem.* 80 (2001) 281.

⁷² C. Giorgio Zambonin, F. Palmisano, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 247.

⁷³ C. Sánchez Brunete, B. Albero, J.L. Tadeo, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1445.

⁷⁴ Y. Hai Lang, Z. Mei Cao, X. Jiang, *Talanta* 66 (2005) 249.

⁷⁵ S. Biselli, K. Bester, H. Hühnerfuss, K. Fent, *Mar. Poll. Bull.* 40 (2000) 233.

⁷⁶ P. Manirakiza, A. Covaci, S. Andries, P. Schepens, *J. Environ. Anal. Chem.* 81 (2001) 25.

fluidos supercríticos (SFE)⁷⁷, extracción con agua subcrítica (SBWE)⁷⁸, extracción con disolvente asistida por ultrasonidos (UASE)⁷⁹ y la extracción con disolvente asistida por microondas (MASE)^{80,81,82} son diferentes técnicas que han sido utilizadas con ese propósito. Sin embargo, el uso rutinario de SFE en la preparación de muestras se considera caro y además, se necesita un mejor conocimiento de los efectos matriz antes de poder usar esta técnica como un método de extracción estándar. Por otra parte, el uso de MASE requiere sistemas de microondas especiales diseñados para el análisis orgánico por razones de seguridad. En este contexto, la extracción de herbicidas asistida por ultrasonidos (SAE) es una técnica alternativa ampliamente utilizada^{83,84,85} con la ventaja de que la cantidad de disolvente orgánico requerida es mucho menor que en las técnicas de extracción clásicas (disminuyendo así el peligro para la salud humana y medio ambiente) además de que no se requiere un equipamiento especial.

En muchas ocasiones se aplican etapas adicionales de clean-up a los extractos obtenidos. Entre éstas, la SPE⁸⁶ es una de las usadas más frecuentemente. Aparte de ésta, la SPME (sin disolvente) también se tiene en cuenta como una técnica analítica alternativa^{87,88}, pero el problema es que las fibras de SPME son relativamente caras y pueden ser frágiles durante la extracción de muestras de suelo. En este sentido, la microextracción en fase líquida (LPME) es un nuevo método de preparación de muestra que es una implementación miniaturizada de la

⁷⁷ R. Kreuzig, A. Koinecke, M. Bahadir, *J. Biochem. Bioph. Meth.* 43 (2000) 403.

⁷⁸ P. Richter, B. Sepúlveda, R. Oliva, K. Calderón, R. Seguel, *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 169.

⁷⁹ J. Gan, S.K. Papiernik, W.C. Koskinen, S.R. Yates, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3249.

⁸⁰ G. Shen, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 167.

⁸¹ F. Hernández, J. Beltran, F.J. López, J.V. Gaspar, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2313.

⁸² E. Fuentes, M.E. Báez, R. Labra, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 40.

⁸³ C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, E. Miguel, J.L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 17.

⁸⁴ C. Sánchez-Brunete, A. Rodríguez, J.L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 85.

⁸⁵ M.A. Mottaleb, M.Z. Abedin, *Anal. Sci.* 15 (1999) 283.

⁸⁶ G. Gatidou, A. Kotrikla, N.S. Thomaidis, T.D. Lekkas, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 153.

⁸⁷ A. Bouaid, L. Ramos, M.J. González, P. Fernández, C. Cámara, *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 13.

⁸⁸ M. Möder, P. Popp, R. Eisert, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 680.

LLE convencional en la cual sólo se usan microlitros de disolvente en vez de los varios cientos de mililitros que se venían usando en la LLE⁸⁹.

1.2.3 Aceite

La preparación de muestras de aceite para la determinación de plaguicidas mediante CG requiere la eliminación completa de la grasa de la muestra, de alta masa molecular, para mantener el sistema cromatográfico en perfectas condiciones. La preparación de la muestra es una etapa crucial en el proceso analítico porque incluso pequeñas cantidades de lípidos pueden dañar las columnas, detectores o causar una supresión de la señal analítica. Este procedimiento incluye extracciones de los analitos de la matriz a un disolvente apropiado para después eliminar las sustancias interferentes de los extractos de disolvente mediante diferentes procesos de clean-up.

A menudo, las etapas de extracción y clean-up para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite se pueden llevar a cabo simultáneamente, en parte o por completo, mediante técnicas como:

- i. SPE^{90,91,92,93,94} utilizando adsorbentes como florisil, alúmina, gel de sílice, etc.

⁸⁹ L. Hou, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 37.

⁹⁰ L. Rastrelli, K. Totaro, F. de Simone, *Food Chem.* 79 (2002) 303.

⁹¹ A. di Muccio, T. Generali, D.A. Barbini, P. Pelosi, A. Ausili, F. Vergori, S. Girolimetti, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 61.

⁹² M. Ramesh, M. Balasubramanian, *Analyst* 123 (1998) 1799.

⁹³ C. Yagüe, S. Bayarri, P. Conchello, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillué, A. Herrera, A. Ariño, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5105.

⁹⁴ E.G. Amvrazi, T.A. Albanis, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9642.

- ii. SPME^{95,96} usando fibras de sílice fundido con diferentes fases como polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), PDMS, carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), DVB-CAR-PDMS, etc.
- iii. SFE^{97,98}, que permite la extracción y separación de los analitos controlando la presión, el modificador o el caudal.

En algunas ocasiones, estas etapas de preparación se podrían reemplazar por una etapa de cromatografía líquida (CL) acoplando CL a CG, donde los componente específicos de una matriz compleja son pre-fraccionados mediante la CL y entonces transferidos “on-line” al sistema CG para la separación analítica⁹⁹.

Sin embargo, el sistema más frecuente es llevar a cabo los procesos de extracción y clean-up por separado en etapas diferentes. Mientras que el método de extracción normalmente depende de la matriz, el proceso de clean-up depende de la naturaleza de las sustancias interferentes que pueden estar presentes en el extracto. Así, hay autores que aplican solamente un proceso de LLE utilizando disolventes de distinta polaridad para extraer residuos de plaguicidas en aceite sin aplicar ningún método adicional de clean-up^{100,101,102,103,104}. Sin embargo, lo habitual es que se apliquen posteriores métodos de clean-up, como por ejemplo

⁹⁵ S. Vichi, A.I. Castellote, L. Pizzale, L.S. Conte, L. Buxaderas, E. López-Tamanes, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 19.

⁹⁶ C.S. Tsoutsis, T.A. Albanis, *J. Environ. Anal. Chem* 84 (2004) 3.

⁹⁷ R. Sánchez, A. Vázquez, D. Riquelme, J. Villén, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2003) 6098.

⁹⁸ M.L. Hopper, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 93.

⁹⁹ R. Sánchez, A. Vázquez, J.C. Andini, J. Villén, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 167.

¹⁰⁰ E. Botitsi, P. Kormali, S. Konton, A. Mourkojanni, E. Stavrakaki, D. Tsipi, *J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 231.

¹⁰¹ A.E. Hiskia, M.E. Atmajidou, D.F. Tsipi, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1998) 570.

¹⁰² P. Cabras, A. Angioni, M. Melis, E.V. Minelli, F.M. Pirisi, *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 327.

¹⁰³ G. Dugo, G. Di Bella L. La Torre, M. Saitta, *Food Control* 16 (2005) 435.

¹⁰⁴ M.A. Aramendía, V. Borau, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, J.M. Porras, F.J. Urbano, *Food Chem.* 97 (2006) 181.

los de baja temperatura^{105,106}, basados en la eliminación de la grasa mediante la separación por precipitación a baja temperatura y la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)¹⁰⁷, la cual se usa, en general, empleando los mismos adsorbentes mencionados en SPE.

No obstante, los procedimientos más efectivos de clean-up están basados en la cromatografía de permeación en gel (GPC), donde las macromoléculas se separan de acuerdo con su tamaño, eluyéndose primero las moléculas de mayor tamaño. Esta metodología es relativamente efectiva eliminando grasas y aceites y se puede aplicar a un amplio intervalo de plaguicidas tanto polares como no polares dentro de la misma inyección en un sistema completamente automatizado^{108,109,110,111}. Recientemente, E. Ballesteros y colab.^{112,113} han aplicado también GPC seguido de CG-MS/MS a la determinación de plaguicidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHA) en aceite de oliva y aceite de orujo de oliva con resultados satisfactorios. Por todas las ventajas que ofrece, este sistema ha sido el seleccionado en esta memoria como método de clean-up después de un proceso de LLE para la determinación de plaguicidas en aceite.

¹⁰⁵ Ch. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, E. Visi, *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 297.

¹⁰⁶ M. Garcés García, S. Morais, M.A. González Martínez, R. Puchades, A. Maquieira, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 484.

¹⁰⁷ C. Ferrer, M.J. Gómez, J.F. García-Reyes, I. Ferrer, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 183.

¹⁰⁸ G.A. Jongenotter, M.A.T. Kerkhoff, H.C.M. Van der Knaap, B.G.M. Vandeginster, *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 17.

¹⁰⁹ J.J. Vreuls, R.J.J. Swen, V.P. Goudrian, M.A.T. Kerkhoff, G.A. Jongenotter, U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 275.

¹¹⁰ A. Gelsomino, B. Petrovicová, S. Tiburtini, E. Magnani, M. Felici, *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 105.

¹¹¹ A. Garrido Frenich, J.L. Fernández Moreno, J.L. Martínez Vidal, F.J. Arrebola Liébanas, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8346.

¹¹² A. García Sánchez, N. Ramos Martos, E. Ballesteros, *Anal. Chim. Acta* 558 (2006) 53.

¹¹³ E. Ballesteros, A. García Sánchez, N. Ramos Martos, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 89.

1.2.4 Aceituna

Mientras que en bibliografía es extenso el número de métodos desarrollados para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite, los métodos aplicados a aceituna son escasos y la suelen dedicarse al análisis de sólo unos pocos analitos. Sin embargo, el análisis de aceitunas es de gran interés puesto que una reducida cantidad de aceitunas muy contaminadas podría causar la contaminación de todo un tanque de almacenamiento de aceite. Así se considera punto crítico de control en almazaras la posible contaminación de la aceituna por plaguicidas¹¹⁴.

La mayoría de los métodos descritos se basan en una extracción sólido-líquido (SLE) utilizando diferentes disolventes extractantes como: acetona, hexano, diclorometano, acetonitrilo y mezclas entre ellos dependiendo de la naturaleza de los plaguicidas a determinar^{115,116,117}, sin aplicar una etapa posterior de clean-up a los extractos. Como alternativa, C. Ferrer y colab.¹⁰⁷ han desarrollado un método de análisis de aceituna (también usado en aceite) aplicando la MSPD con aminopropil como material adsorbente y un posterior clean-up utilizando florisil. El problema es que se ha aplicado a un número reducido de herbicidas e insecticidas, nueve en concreto. Más recientemente, este método también ha sido utilizado por Cunha y colab. para la determinación de phosmet¹¹⁸ así como fenthion¹¹⁹ (junto con sus respectivos metabolitos) en aceitunas.

Es evidente que se hace necesario el desarrollo de métodos fiables de análisis de residuos de plaguicidas en aceituna para asegurar la producción de aceite de oliva de calidad para la salud

¹¹⁴ E. del Castillo Quesada, V. Torres Saura, B. Álvarez Fernández, *Hig. Sanid. Ambient.* 7 (2007) 256.

¹¹⁵ P. Caboni, M. Cabras, A. Angioni, M. Russo, P. Cabras, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3491.

¹¹⁶ P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, F.M. Pirisi, F. Cabitza, M. Pala, *Food Addit. Contam.* 17 (2000) 855.

¹¹⁷ P. Cabras, P. Caboni, M. Cabras, A. Angioni, M. Russo, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2576.

¹¹⁸ S.C. Cunha, J.O. Fernandes, M. Beatriz, P.P. Oliveira, *Talanta* 73 (2007) 514.

¹¹⁹ S.C. Cunha, J.O. Fernandes, M. Beatriz, P.P. Oliveira, *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 156.

y la confianza del consumidor. En la presente memoria se ha desarrollado un método de multiresiduos de plaguicidas en aceituna que abarca varios grupos de materias activas con diferentes propiedades químicas utilizando un mismo procedimiento de extracción (basado en homogeneización con disolvente) y de posterior clean-up. Consideramos de interés comparar el método de extracción empleado con el método Abencor¹²⁰, un sistema ampliamente utilizado en los laboratorios para la determinación del rendimiento graso y que implica la obtención de aceite a partir de aceituna utilizando un procedimiento mecánico que es el que más se asemeja al que se lleva a cabo en las almazaras. Hasta el momento no hemos encontrado referencias de que esta comparación se haya llevado a cabo anteriormente.

¹²⁰ J.M. Martínez, E. Muñoz, J. Alba, J. Lazón, *Grasas y Aceites* 26 (1975) 379.

2. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA RECOLECCIÓN Y EL LAVADO DE ACEITUNA SOBRE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

2.1 Influencia del método de recolección

Existen diferentes métodos de llevar a cabo la recolección de las aceitunas. El método utilizado para cosechar las aceitunas depende de la técnica cultural, tamaño y forma del olivo y el terreno de cultivo. Estos métodos se pueden agrupar en dos categorías: recolección del árbol (fruto de vuelo) y recolección del suelo (fruto de suelo). La separación, antes del proceso de elaboración, de estas dos clases de frutos con potencialidades cualitativas y cuantitativas diferentes es esencial para obtener unos resultados adecuados en la elaboración del aceite de oliva virgen. Cuando la molturación de la aceituna se hace de forma indiscriminada, sin realizar la separación de los frutos por calidades se malogra, en la mayor parte de los casos, la calidad de las partidas de fruto que potencialmente pueden proporcionarla; esta forma de actuar hace que el porcentaje de aceites de oliva obtenidos, con calidad de "Extra", sea reducido, disminuyéndose, en consecuencia, el valor de los aceites.

Aparte de los parámetros típicos de calidad y características organolépticas, el método de recolección puede ser relevante en la presencia de residuos de plaguicidas en aceitunas, especialmente herbicidas que son aplicados sobre el suelo. Sin embargo, la influencia de la separación del fruto de vuelo y suelo en la recepción de las aceitunas en las almazaras sobre los niveles de plaguicidas del aceite obtenido no había sido evaluada hasta que se abordó en la presente memoria. No se han encontrado trabajos relacionados con la comparación de niveles de plaguicidas encontrados en aceitunas de suelo y de vuelo.

2.2 Influencia del proceso de lavado de aceituna en las almazaras

A pesar de la importancia del aceite de oliva en los países mediterráneos, son pocos los estudios realizados sobre el comportamiento de los plaguicidas después del tratamiento de aceituna. Una revisión publicada por Lentza-Rizos y Avramides¹²¹ ha resumido los resultados de las investigaciones sobre residuos de plaguicidas en aceituna y aceite de oliva, incluyendo principalmente una descripción de los plaguicidas encontrados en aceites provenientes de diferentes regiones y países¹²². Asimismo, otros autores han evaluado, en lo que respecta a los niveles de residuos de plaguicidas, su degradación en el campo de cultivo¹²³, persistencia en la aceituna después del tratamiento en el campo¹¹⁵ y efecto del almacenamiento¹²⁴, procesado¹²⁵ y refinamiento del aceite¹²⁶. Dada la escasez de datos bibliográficos, se pretende por tanto, estudiar el comportamiento de un grupo de plaguicidas después de entrar en contacto con la aceituna, evaluando qué fracción podría ser eliminada del fruto con el proceso de lavado.

En las almazaras es necesaria una etapa previa de limpieza en el procesado de la aceituna, sobre todo aquella recogida del suelo. Después de llegar a la almazara, la aceituna se introduce en tolvas a ras del suelo y se transporta mediante una cinta transportadora a dispositivos ventiladores donde se eliminan las hojas, ramas y otras materias ligeras. Posteriormente pasa por una lavadora para eliminar el polvo, tierra y el barro que puede acompañarla, especialmente si el fruto se recoge del suelo (proceso de lavado). Hay almazaras que procesan separadamente el fruto recogido directamente del árbol (aceitunas de vuelo) y las que se

¹²¹ Ch. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 141 (1995) 111.

¹²² Ch. Lentza-Rizos, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1096.

¹²³ R. Santiago, R. de Prado, A.R. Franco, *Comm. in Agric. and Appl. Biolog. Sci.* 68 (2003) 409.

¹²⁴ Ch. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, R.A. Roberts, *Pest. Sci.* 40 (1994) 63.

¹²⁵ G. Morchio, R. de Andreis, G.R. Verga, *Rivista Italiana delle Sostanza Grasse* 69 (1992) 147.

¹²⁶ M.V. Ruiz Méndez, I. Pérez de La Rosa, A. Jiménez Márquez, M. Uceda Ojeda, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 23.

recogen del suelo (aceitunas de suelo), pero también hay otras que no tienen líneas de procesamiento separados para ambos tipos de aceituna.

Hasta la fecha, no existen referencias de estudios llevados a cabo para evaluar el efecto que estas etapas de la producción del aceite de oliva (la recolección y el lavado) tienen sobre la presencia y niveles de concentración de residuos de plaguicidas en aceitunas y, consecuentemente, en el aceite. Es un hecho bastante llamativo debido a que la práctica común del lavado de la aceituna en las almazaras para la eliminación del material que las acompaña puede jugar un papel crucial en la eliminación de residuos de plaguicidas presentes en la aceituna como se ha informado que ocurre en otros productos agrícolas^{127,128}. Sólo se ha llevado a cabo un intento para evaluar el efecto del lavado de aceituna sobre los niveles de residuos de plaguicidas en este fruto¹²⁹. Este trabajo se limitaba a residuos de insecticidas, siendo la aceituna lavada en el laboratorio, no en las almazaras. Los efectos del lavado de aceituna sobre los residuos de insecticidas variaban desde la no reducción hasta una disminución de un 45% en los niveles.

2.3 Influencia de la contaminación del agua de lavado. Descontaminación

En esta memoria también se ha pretendido estudiar la eficiencia del lavado de aceituna a medida que las aguas de las lavadoras se van ensuciando, puesto que, en la situación más desfavorable, podría ocurrir la contaminación de aceitunas libres de residuos en la almazara. Hasta el momento no se ha encontrado en bibliografía referencias de estudios similares.

¹²⁷ E.R. Elkins, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (1989) 533.

¹²⁸ M.J. Chavarri, A. Herrera, A. Ariño, *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004)1253.

¹²⁹ P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, M. Karim, E.V. Minelli, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2244.

En caso de que la eficacia de lavado disminuya progresivamente sería necesario un método de descontaminación para permitir el reciclado de esa agua. Si bien se han descrito algunos métodos de purificación de agua residuales de lavado en almazaras¹³⁰ así como aguas residuales procedentes de la producción del aceite de oliva¹³¹, pero ninguno de ellos trata la eliminación de residuos de plaguicidas. Se centran en el pH, polifenoles y demanda química de oxígeno (DQO).

¹³⁰ J. Beltrán de Heredia Alonso, J. Torregrosa Anton, J.R. Domínguez Vargas, J. García Rodríguez, *Grasas y Aceites* 52 (2001) 184.

¹³¹ A. Amhajji, M. Faid, M. el Yachioui, *Grasas y Aceites* 56 (2005) 121.

V. Discusión conjunta de resultados

IV. DISCUSIÓN CONJUNTA DE RESULTADOS

1. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

1.1 Reactivos y materiales

➤ Patrones de plaguicidas

Todos los patrones de plaguicidas así como el patrón interno del sistema CG/ECD, pentacloronitrobenzeno (quintoceno) y el patrón de recuperación, trifenilfosfato (TPP) se adquirieron de Riedel-de-Häen (Seelze-Hannover, Alemania), con una pureza >99%. El patrón interno del sistema CG/TSD, cafeína, fue suministrado por Fluka con una pureza también >99%.

Las disoluciones de reserva de cada plaguicida individual así como del patrón de recuperación y de los patrones internos se prepararon a una concentración de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesando directamente la cantidad correspondiente y enrasando a 100 mL con acetona. Las disoluciones se mantuvieron en el congelador a -18°C . Las disoluciones de trabajo se prepararon mediante las correspondientes diluciones con ciclohexano y se mantuvieron en refrigeración a 4°C .

➤ Disolventes y reactivos

Se pueden resumir en la Tabla que se muestra a continuación:

Tabla 5. Disolventes y reactivos utilizados.

		Fabricante	Grado
Disolventes	Ciclohexano	PANREAC	HPLC
	Diclorometano	PANREAC	HPLC
	Acetona	PANREAC	HPLC
	Acetonitrilo	PANREAC	HPLC
	Acetato de etilo	PANREAC	HPLC
	Acetonitrilo	PANREAC	HPLC
	Metanol	PANREAC	HPLC
	Hexano	PANREAC	QP
	Éter de petróleo	PANREAC	QP
Reactivos	Na ₂ SO ₄	PANREAC	HPLC
	Carbón activo	PANREAC	QP
	Tierras diatomeas	PANREAC	
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	MERCK	QP
	Al ₂ (SO ₄) ₃	MERCK	QP

El agua desionizada se obtuvo a partir de un equipo de ósmosis inversa Milli RO 12 Plus (MILLIPORE) acoplado con un equipo de refinado Milli Q Plus 185 (MILLIPORE).

➤ Gases empleados

Los gases empleados se resumen en la siguiente Tabla:

Tabla 6. Gases utilizados.

	Gas	Fabricante	Pureza
CG-MS	Helio	PRAXAIR	99,999%
	Dióxido de carbono	PRAXAIR	-
CG-ECD/TSD	Nitrógeno	AIR LIQUID	99,999%
	Hidrógeno	AIR LIQUID	-
	Aire sintético	AIR LIQUID	-

1.2 Instrumentación y aparatos

➤ Cromatógrafo de gases CP-3800 (VARIAN, Walnut Creek, CA, USA) (Figura 52) equipado con un detector de captura electrónica, ECD con fuente de ^{63}Ni y detector termoiónico específico, TSD. Dispone de dos inyectores split/splitless 1177 con control electrónico del flujo (EFC).



Figura 52. Cromatógrafo CG-ECD/TSD.

➤ Cromatógrafo de gases VARIAN CP-3800 acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones Saturn 2000 Figura 53. El cromatógrafo estaba equipado con un muestreador automático 8200 y un inyector split/splitless de temperatura programable (PTV) 1079.

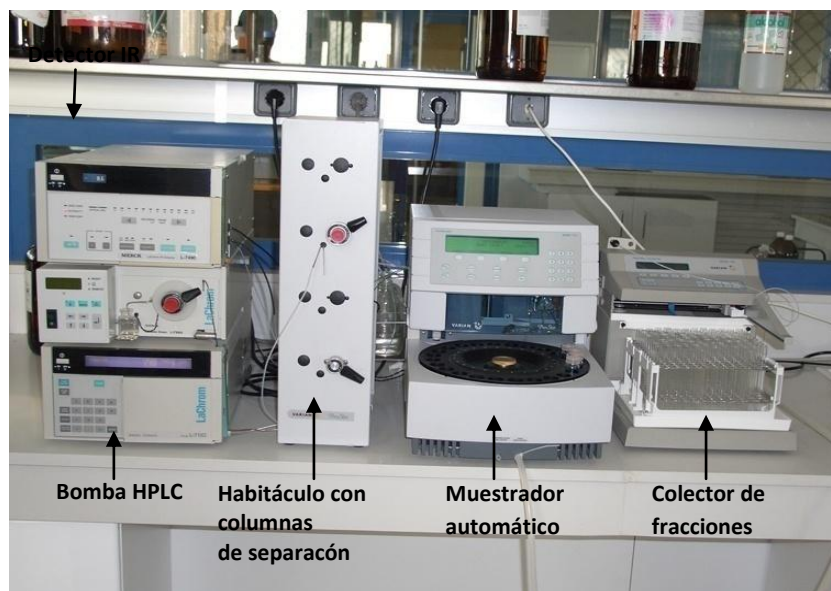


Figura 53. Cromatógrafo CG-MS/MS.

➤ Sistema para GPC compuesto por una bomba de HPLC L711 LaChrom (MERCK) y dos columnas de Envirogel (WATERS): columna principal de limpieza (300 mm x 19 mm) y pre-columna (150 mm x 19 mm). Se utilizó un detector de índice de refracción (IR) L-7490 LaChrom (MERCK) así como un colector de fracciones (704 VARIAN ProStar) y un automuestreador (410 VARIAN ProStar).

Las distintas partes de las que consta el sistema de GPC aparecen en la siguiente Figura:

Figura 54. Sistema GPC.



A continuación se muestran las dos columnas en serie de la GPC (Vista transversal del habitáculo representado en la Figura 54).



Figura 55. Columnas de GPC.

La muestra (mezcla de analitos) se pone primero en contacto con la pre-columna (columna de menor longitud) pasando a continuación a una segunda columna de limpieza situada en serie (columna de mayor longitud).

➤ Kit de SPE (SUPELCO, Bellefonte, PA) con 12 posiciones, manómetro regulador de vacío y trompa de vacío de agua. Se emplearon cartuchos Supelclean LC-18 para SPE empaquetados con 500 mg de C-18.

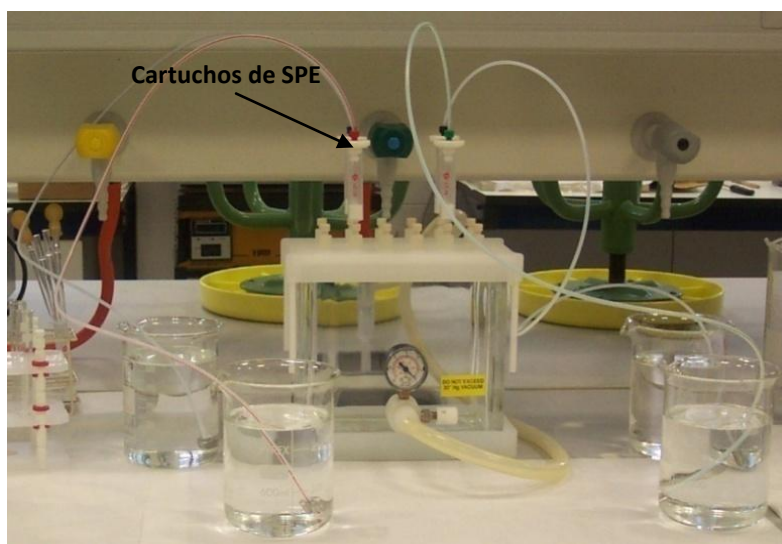


Figura 56. Kit de extracción en fase sólida.

➤ Sistema Abencor compuesto por un molino de martillo para moler las aceitunas, una termobatidora provista de unos cazos donde se agita la pasta de aceituna y una centrífuga para separar las fases (Abengoa, Sevilla).

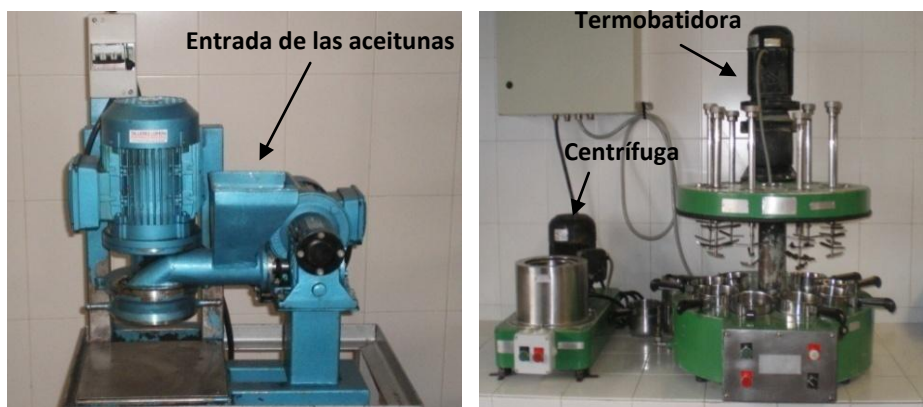


Figura 57. Sistema Abencor.

2. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A continuación se describe el desarrollo, optimización y validación de cada uno de los métodos de análisis de multiresiduos en cada una de las matrices de interés: agua, suelo/lodos, aceite y aceituna. Antes, se ha considerado oportuno incluir un apartado donde se indican los parámetros experimentales seleccionados para cada uno de los cromatógrafos así como el orden de elución de cada uno de los plaguicidas en los tres sistemas cromatográficos.

2.1 Condiciones de la separación cromatográfica

✓ CG-ECD

Las temperaturas del inyector y detector eran 270 y 300°C, respectivamente. Se utilizó N₂ como gas portador con un flujo de 1 mL min⁻¹. El gas de relleno era igualmente N₂, con un caudal de 30 mL min⁻¹. Se empleó una columna capilar de sílice fundida VARIAN (30 m x 0.25 mm i.d.) CP-SIL 5CB y un espesor de fase estacionaria de 0.25 µm así como una pre-columna de

sílice fundido sin fase estacionaria (2 m x 0.25 mm i.d.). El programa de temperatura utilizado en el horno de columna se resume en la Tabla 7. Se inyectaba 1 μl de muestra en modo splitless.

✓ CG-TSD

Las temperaturas del inyector y detector eran 270 y 300°C, respectivamente. El gas portador empleado fue N_2 con un flujo de 2 mL min^{-1} y para el detector los gases empleados eran H_2 , con un caudal de 4 mL min^{-1} , aire a 175 mL min^{-1} y N_2 como gas de relleno, con un caudal de 30 mL min^{-1} . Se empleó una columna capilar de sílice fundida VARIAN (30 m x 0.32 mm i.d.) CP-SIL 8CB y un espesor de fase estacionaria de 0.25 μm así como una pre-columna de sílice fundida sin fase estacionaria (2 m x 0.32 mm i.d.). El programa de temperatura utilizado en el horno de columna también se resume en la Tabla 7. Se inyectaba 1 μl de muestra en modo splitless.

Tabla 7. Programas de temperaturas usados en CG-ECD/TSD

ECD		TSD	
70°C (2 min)	$\xrightarrow{25^\circ\text{C/min}}$ 180°C	70°C (2 min)	$\xrightarrow{25^\circ\text{C/min}}$ 180°C
180°C (10 min)	$\xrightarrow{4^\circ\text{C/min}}$ 240°C	180°C (10 min)	$\xrightarrow{4^\circ\text{C/min}}$ 200°C
240°C	$\xrightarrow{30^\circ\text{C/min}}$ 280°C(1min)	200°C	$\xrightarrow{50^\circ\text{C/min}}$ 280°C

✓ CG-MS/MS

Se utilizó una columna capilar de sílice fundida VARIAN (30 m x 0.25 mm i.d.) CP-SIL 5CB y un espesor de fase estacionaria de 0.25 μm así como una pre-columna de sílice fundida sin fase estacionaria (2 m x 0.25 mm i.d.).

La trampa de iones operaba en el modo de impacto electrónico (EI) y se usó la opción MS/MS para una segunda fragmentación. Como gas portador se usó Helio con un caudal de 1 mL min^{-1} . Las temperaturas del manifold, línea de transferencia y la trampa eran 50, 270 y 200°C , respectivamente.

A continuación se van a describir algunas funciones básicas del espectrómetro de trampa de iones Saturn (MS/MS) para impacto electrónico (EI):

- Formación de iones y expulsión de iones de la matriz

La ionización de la muestra y de matriz que coeluye se da mediante EI. Hay que optimizar el tiempo de ionización, tiempo durante el cual el haz de electrones del filamento entra en la trampa de iones. Durante la ionización, se aplica un potencial de multifrecuencia a la trampa de iones para expulsar por resonancia iones por debajo de la masa del ion precursor. Esto elimina los iones de baja m/z que no interesan y que podrían afectar a la eficiencia del almacenamiento del ion precursor, mejorando la resolución de masa de los siguientes pasos del MS/MS. Después de la ionización se aplica un segundo potencial a la trampa para eliminar aquellos iones cuya m/z es mayor que la del ion precursor. Esto elimina la mayor parte de los iones que quedan en la trampa y que no interesan. Ahora queda en la trampa el número óptimo de iones precursores que tienen el valor deseado de m/z con algunos pocos iones con valores de m/z ligeramente por encima y por debajo de éste.

El software AGC (Automatic Gain Control, control automático de ganancia) permite controlar el tiempo de ionización para que la cantidad de iones en la trampa se mantenga en el nivel óptimo. El número de iones formado en la trampa también depende de la intensidad del haz de electrones. En general, un aumento de la corriente de emisión del filamento aumenta la cantidad de iones producidos aunque la relación no es siempre lineal. En este caso, se establecieron 2000 cuentas para el AGC target y una corriente de emisión de $80 \mu\text{A}$

- Formación de iones productos

Los iones producto se forman a partir del precursor mediante disociación inducida por colisión (CID; Collision-Induced Dissociation). El ion precursor colisiona constantemente con helio en la trampa, su energía traslacional aumenta y las colisiones pueden convertir la energía cinética traslacional en energía vibracional que puede romper uno o más enlaces químicos en el ion, formando iones de m/z menor que el original. Hay que aplicar un potencial a la trampa para aumentar la energía cinética traslacional del ion precursor. La amplitud de este potencial se llama amplitud de excitación CID (CID excitación amplitude) y el tiempo durante el que se aplica el potencial se llama tiempo de excitación (excitation time).

- Desarrollo automático del método: AMD (Automated method development)

El AMD se usa para optimizar las condiciones CID en la formación de los iones producto para un método MS/MS. El software calcula automáticamente una serie de parámetros. En la presente memoria, los pasos seguidos en AMD para optimizar la amplitud de excitación han sido los siguientes:

1. Determinar el ion precursor de cada analito (seleccionándolo en función de su relación m/z y su abundancia relativa, siendo ambas tan altas como sea posible) y el tiempo de retención para cada compuesto en una inyección usando el modo El normal. Se construye entonces un método de adquisición dividiendo el cromatograma en diferentes segmentos, cada uno de ellos con unas condiciones de adquisición. En la Figura 58 se muestra la ventana donde se ajustan los parámetros en el método para el software Saturn 2000.

	Segment Description	Start (min.)	End (min.)	Low Mass (m/z)	High Mass (m/z)	Ionization Mode	Ion Preparation
1	FIL/MUL DELAY	0,00	5,50	40	650	None	None
2	Diuron	5,50	10,00	100	220	El Auto	MS/MS
3	HCH	10,00	11,55	120	230	El Auto	MS/MS
4	Simazine/Atraz/Dimet	11,55	12,30	64	230	El Auto	MRM
5	bH/Triet/HC/Terb/Dia	12,30	13,50	95	310	El Auto	MRM

	Parent Ion Mass	Isolation Window	Waveform Type	Excitation Storage Level	Excitation Amplitude
1	219,0	3,0	Non-resonant	100,0	72,00
2	200,0	3,0	Non-resonant	90,0	88,00
3	219,0	3,0	Non-resonant	100,0	74,00
4	214,0	3,0	Non-resonant	100,0	88,00
5	304,0	3,0	Non-resonant	110,0	67,00

Figura 58. Pantalla de edición del método en el Saturn 2000.

2. Se usan las condiciones establecidas por defecto en AMD para determinar la masa de los iones producto. Una vez que se determina el valor m/z del ion producto se hace el siguiente cálculo: la relación m/z dividida por 1.4 = el nivel de amplitud de excitación CID de excitación más alto. El AMD permite que se incremente la amplitud de excitación CID scan por scan (25v, 30v, 35v) hasta 10 scans y el ciclo se repite, pudiendo comparar así espectros de masas obtenidos con diferentes amplitud de excitación para seleccionar la óptima. Esto se puede hacer con dos inyecciones usando AMD. La primera inyección usa incrementos de voltaje de 10 voltios. Una vez que se está cerca del voltaje óptimo en la primera inyección se hace una segunda inyección disminuyendo los incrementos del voltaje CID para optimizarlo.

- Monitorización de reacciones múltiples (Multiple Reaction Monitoring, MRM)

El modo MRM usa diferentes iones precursores y diferentes parámetros de disociación, permitiendo hacer MS/MS de hasta diez iones precursores diferentes. Esto

es útil para resolver compuestos que coeluyen, los cuales se incluirían dentro del mismo segmento (Figura 58).

Además de la librería comercial de que dispone el ordenador que controla el sistema, se creó una librería EI-MS/MS para los plaguicidas seleccionados bajo nuestras condiciones experimentales (en la matriz de interés de que se trate).

La Tabla 8 muestra los diferentes parámetros usados para el EI y posterior fragmentación MS/MS.

Tabla 8. condiciones EI-MS/MS.

Plaguicida	Segmento	Ion precursor (m/z)	Ion de cuantificación (m/z)	Amplitud de excitación CID (V)	Nivel de almacenamiento (m/z)
	1		Elución del disolvente		
Diuron	2	187	124+187+159	83	80
α -HCH	3	219	181:183	74	100
Dimetoato	4	215	79	98	145
Simazina	4	125	138	52	54
Atrazina	4	201	200	75	100
Trietazina	5	200	104	88	90
β -HCH	5	219	181:183	72	100
Terbutilazina	5	214	173	88	100
δ -HCH	5	219	181:183	74	100
Diazinon	5	304	179	67	110
Lindano	6	219	181:183	74	100
Formotion	7	224	125	81	90
Clorpirifos-metil	8	286	208	76	85
Heptacloro	9	272	235:237	60	75
Carbarilo	9	144	114+116	59	60
Pirimifos-metil	10	290	151	65	85
Terbutrina	10	241	185+170	51	75
Fenitroion	10	260	125	61	71
Clorpirifos	11	314	258	100	170
Aldrin	11	263	191	99	90
Heptaclor-epox-a	12	353	261:265	51	75
Heptaclor-epox-b	12	289	251:254	87	100
Folpet	13	260	232	54	85
α -Endosulfan	14	339	263:269	58	125
Dieldrin	15	277	204:208	96	100
Endrin	16	281	243:245+209	61	75
β -Endosulfan	17	339	263:269	62	125
DDD	18	235	165	69	80
Endosulfan sulfato	19	387	285:291	38	71
DDT	20	235	165	67	80
TPP	21	325	168:169	86	100

Se ha trabajado con inyección (en modo splitless) de grandes volúmenes de muestra (20 μ L en concreto), pudiendo así mejorar el límite de detección de los analitos. Para ello, se ha utilizado un relleno introducido en el insert de vidrio del inyector a modo de “filtro” para la matriz. Este relleno se denomina Carbofrit y se coloca tal como se muestra en la Figura 59. De esta manera se elimina casi completamente el disolvente de inyección mediante la adsorción de la muestra en el Carbofrit (manteniendo el flujo de split abierto). Posteriormente, y ya con el split cerrado, se calienta el inyector para desorber los compuestos del Carbofrit hacia la columna. Si se

mantiene caliente poco tiempo el inyector, el Carbofrit solamente desorbe los plaguicidas a analizar mientras que la matriz se mantiene adsorbida en el mismo.

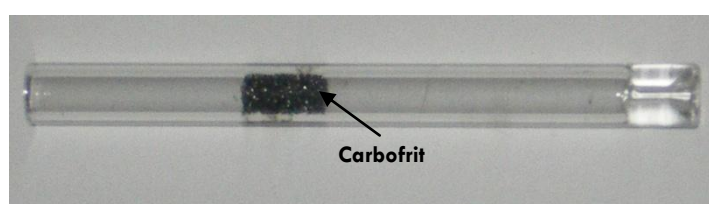


Figura 59. Insert utilizado para inyección de grandes volúmenes.

El programa de temperatura del inyector así como el correspondiente al horno de la columna se esquematizan en la siguiente Tabla:

Tabla 9. Programas de temperatura usados en CG-MS/MS.

Inyector	Horno de columna
	70°C (2 min) $\xrightarrow{25^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 180°C
70°C (0.5 min) $\xrightarrow{100^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 330°C	180°C (10 min) $\xrightarrow{4^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 240°C
	240°C $\xrightarrow{30^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280°C (1 min)

En la Tabla 10 se muestra, para cada uno de los sistemas cromatográficos, el orden relativo de elución y los correspondientes tiempos de retención (t_R) de los plaguicidas estudiados, así como patrones internos y de recuperación. El número de cada plaguicida coincide con el que aparece en los distintos cromatogramas que se muestran en los apartados posteriores.

Tabla 10. *Tiempos de retención de los plaguicidas y patrones internos.*

CG-ECD			CG-TSD		CG-MS/MS			
Nº	Plaguicida	t _R (min)	Nº	Plaguicida	t _R (min)	Nº	Plaguicida	t _R (min)
1	Diuron	07.091	1	Dimetoato	09.752	1	Diuron	6.908
2	α-HCH	11.313	2	Simazina	0.9834	2	α-HCH	11.265
3	β-HCH	11.741	3	Atrazina	09.996	3	Dimetoato	11.760
4	Lindano	12.462	4	Terbutilazina	10.459	4	Simazina	11.971
5	δ-HCH	12.642	5	Diazinón	10.917	5	Atrazina	12.095
6	Quintoceno	12.923	6	Cafeína	11.713	6	Trietazina	12.621
7	Diazinon	13.506	7	Clorpirifos-metil	12.860	7	.	12.644
8	Formotion	13.994	8	Terbutrina	14.233	8	-HCH Terbutilazina	12.666
9	Clorpirifos-metil	16.031	9	Pirimifos-metil	14.233	9	δ-HCH	12.7500
10	Heptacloro	17.141	10	Malatión	15.186	10	Diazinon	12.801
11	Fenitrotion	17.647	11	Clorpirifos	15.815	11	Lindano	14.500
12	Malation	18.603	12	Metidatión	19.589	12	Formotion	14.916
13	Aldrin	19.412	13	TPP	22.650	13	Clorpirifos-metil	15.849
14	Heptaclor-epox-a	21.473				14	Heptacloro	16.861
15	Heptaclor-epox-b	21.689				15	Carbarilo	17.110
16	Metidation	22.274				16	Pirimifos-metil	17.833
17	α-Endosulfan	23.520				17	Terbutrina	18.125
18	Dieldrin	24.927				18	Fenitrotion	18.165
19	Endrin	25.860				19	Clorpirifos	19.208
20	β-Endosulfan	26.012				20	Aldrina	19.386
21	DDD	26.883				21	Heptaclor-epox-a	21.736
22	Endosulfan sulfato	28.132				22	Heptaclor-epox-b	21.990
23	DDT	29.001				23	Folpet	22.882
						24	α-Endosulfan	23.931
						25	Dieldrin	25.475
						26	Endrin	26.633
						27	β-Endosulfan	27.327
						28	DDD	27.767
						29	Endosulfan	29.393
						30	DDT	29.908
						31	TPP	30.627

2.2 Método de determinación de plaguicidas en agua

El agua de lavado de aceituna contiene gran cantidad de materiales en suspensión procedente del suelo recogido junto con las aceitunas. Además, dichas aguas de lavado de aceituna contienen cantidades significativas de lípidos (triglicéridos, ceras, etc.) y pigmentos (luteína, beta-carotenos, etc.) que proceden de la ruptura de aceitunas durante su recogida y el vertido del aceite al agua.

Para extraer los plaguicidas del agua (así como para eliminar los lípidos y otros posibles interferentes) y aumentar la sensibilidad del procedimiento analítico para el análisis de las muestras de agua de lavado, se ha desarrollado un procedimiento SPE previo al análisis cromatográfico.

2.2.1 Tratamiento previo de la muestra

La gran cantidad de materiales en suspensión hizo necesario una filtración previa de las muestras usando distintos filtros con tamaños de poro decreciente, desde tamaño de poro de 8 mm hasta filtros de membrana de 0.45 μm . El volumen de agua que se procesa para el análisis es 1 litro.

La optimización se llevó a cabo con agua de entrada a las lavadoras, fortificada con una concentración de 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los 32 plaguicidas objeto de estudio (el oxifluorfen sólo se incluyó en los estudios finales objeto de esta Memoria).

2.2.2 Procedimiento de extracción y clean-up

El soporte sólido elegido, gel de sílice C_{18} (500 mg), retiene tanto los plaguicidas como el resto de lípidos y pigmentos que quedan en las muestras de agua. Para la elución de los plaguicidas del soporte sólido se probaron diversos disolventes orgánicos de diferente polaridad: acetona, acetonitrilo, n-hexano y diclorometano, empleando un volumen de 4 mL de cada uno de ellos. El diclorometano resultó ser el disolvente más efectivo para la elución de los plaguicidas, no observándose interferencias mayores de lípidos y pigmentos en los cromatogramas correspondientes a los extractos. Las recuperaciones que se obtuvieron con acetonitrilo eran un poco menores que con diclorometano y también se observó una elución parcial de los pigmentos del soporte sólido. Una vez seleccionado el eluyente, se estudio la eficacia de la

elución empleando diferentes volúmenes del mismo. Se emplearon desde una hasta seis porciones de 1 mL de disolvente. Las mejores recuperaciones se obtuvieron a partir de 4 mL de disolvente, y como no había diferencia en los valores de recuperación para mayores volúmenes, se eligió un volumen de 4 mL para la elución de los plaguicidas.

También se probaron varios volúmenes de muestra de agua fortificada con $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ desde 250 hasta 2000 mL, escogiéndose finalmente 1 L de muestra. Dos fueron las razones para ello: (1) proporcionaba una alta sensibilidad sin aumentar significativamente el tiempo de análisis y (2) no saturaba la fase sólida.

2.2.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación

✓ CG-ECD/TSD

Con el objeto de comprobar la presencia de picos interferentes procedentes de la matriz en la determinación de los plaguicidas, se analizó un agua exenta de plaguicidas así como la misma matriz fortificada con $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada plaguicida. Los cromatogramas se muestran en la Figura 60 y Figura 61. Como se puede observar, en el sistema ECD aparecen algunas interferencias alrededor del tiempo de retención del diuron. En el sistema TSD se obtiene una línea base más regular para la misma muestra debido a su mayor selectividad.

La identificación de los plaguicidas se hace en base a los tiempos de retención estándar. La cuantificación se lleva a cabo mediante el método del patrón interno, con el objeto de corregir las desviaciones debidas a la inyección manual de la muestra. Los patrones internos son quintoceno ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y cafeína ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) para los sistemas CG-ECD y CG-TSD, respectivamente.

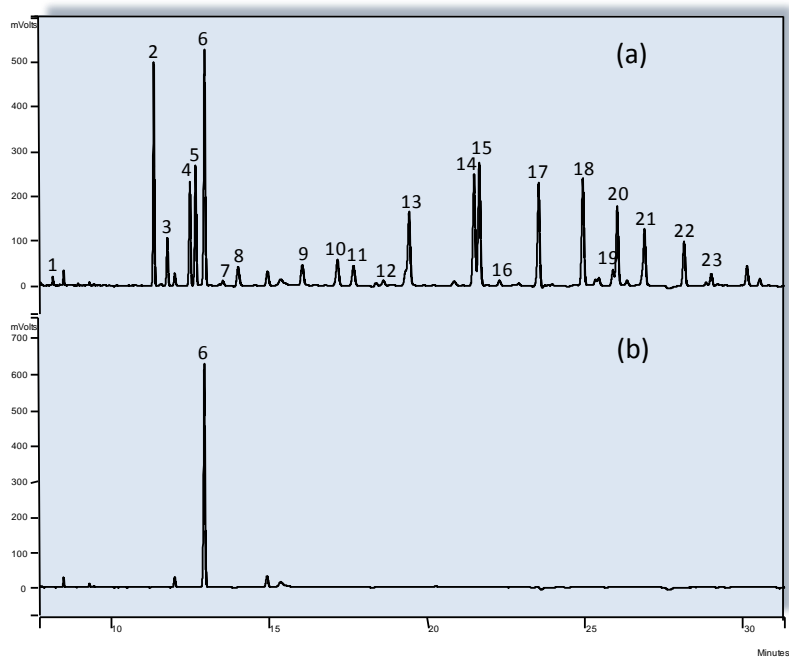


Figura 60. Cromatograma CG-ECD:(a) blanco fortificado 100 µg L⁻¹ y (b) blanco. El número de cada plaguicida es el que se corresponde con la Tabla 10.

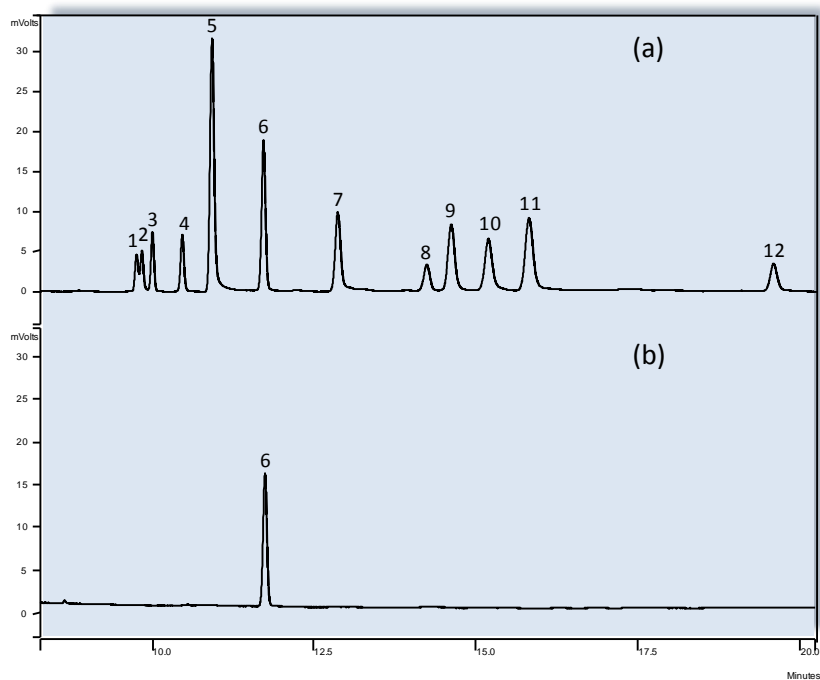


Figura 61. Cromatograma CG-TSD: (a) blanco fortificado 100 µg L⁻¹ y (b) blanco. El número de cada plaguicida es el que se corresponde con la Tabla 10.

Como se puede observar, en general, se consigue una separación satisfactoria. No obstante, hay algunas excepciones: los pares dimetoato (1) y simazina (2) en TSD y los dos isómeros del heptaclor-epóxido (14 y 15) y endrín (19) y β -endosulfan (20) en ECD, restringiendo así la exactitud de su cuantificación para bajas concentraciones. Este problema se va a repetir en los siguientes métodos desarrollados puesto que esta mala separación es independiente de la matriz en la se estén determinando los plaguicidas.

✓ CG-MS/MS

La Figura 62 muestra el cromatograma de una muestra exenta de plaguicidas así como la misma matriz fortificada con $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada plaguicida. En general, no se observan picos interferentes debido a la disminución de la señal de fondo originada por el aislamiento de un solo ión y su posterior fragmentación. Asimismo, los espectros MS/MS obtenidos para cada plaguicida en el blanco fortificado se compararon con los obtenidos en disolvente, observándose un buen ajuste todos los casos. Se proporciona así una confirmación inequívoca.

La confirmación de la identidad de los resultados positivos en las muestras era posible mediante la monitorización del ión de cuantificación correspondiente (m/z) para cada plaguicida. Se deben cumplir las siguientes condiciones para que una confirmación sea positiva:

- Los tiempos de retención de los plaguicidas en las muestras tienen que estar dentro del margen ± 0.5 s de los correspondientes a los plaguicidas en el patrón.
- El ajuste espectral (Fit) obtenido por comparación del espectro de masa de la muestra con el correspondiente al patrón tiene que ser ≥ 700 (en una escala de 0-1000).
- La intensidad relativa de los iones mayoritarios en el espectro de masa de la muestra tiene que coincidir con la del patrón en disolvente.

El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante el método del patrón externo. No se usó patrón interno debido a la buena reproducibilidad del muestreador automático usado para la inyección de las muestras.

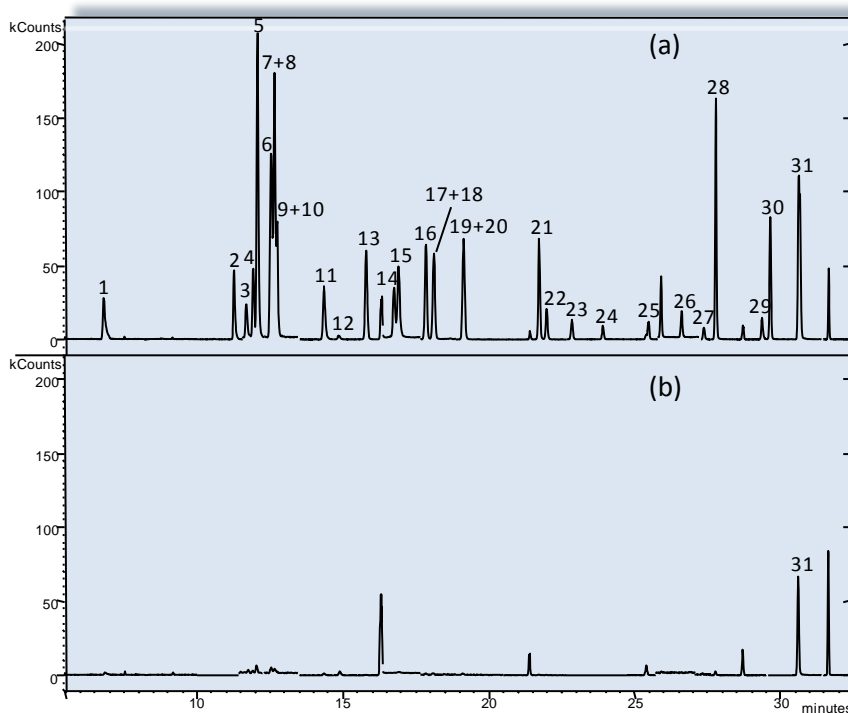


Figura 62. Cromatograma CG-MS/MS TIC (corriente iónica total): (a) blanco fortificado $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y (b) blanco. El número de cada plaguicida es el que se corresponde con la Tabla 10.

2.2.4 Validación de los métodos cromatográficos

Se llevó a cabo la validación de los tres sistemas cromatográficos: CG-ECD, CG-TSD y CG-MS/MS.

2.2.4.1 CALIBRACIÓN

La singularidad de la matriz, agua de lavado de aceitunas que contiene posibles sustancias interferentes como componentes del suelo y sustancias provenientes de la ruptura de la piel de las aceitunas (pigmentos, lípidos, etc.), podría implicar la existencia de efecto matriz. Se ha llevado a cabo una evaluación de este efecto matriz para determinar si se debía llevar a cabo la calibración con patrones preparados en matriz o en disolvente.

Para establecer la influencia de esta matriz en los valores de recuperación, los extractos finales de tres muestras fortificadas (100 ng L^{-1}) se cuantificaron frente a patrones preparados en disolvente y frente a patrones preparados en matriz.

✓ CG –ECD/TSD

Los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del efecto matriz se muestran en la Tabla 11 y Tabla 12 para CG-ECD y CG-TSD, respectivamente.

Tabla 11. Cuantificación de muestras fortificadas (100 ng L^{-1}) por CG-ECD usando patrones en disolvente y en matriz.

Plaguicida	Recuperación (%)					
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Matriz	Disolv.	Matriz	Disolv.	Matriz	Disolv.
Diuron	102	131	116	133	89	128
α -HCH	119	140	128	148	111	144
β -HCH	100	112	100	124	95	130
Lindano	91	159	113	160	84	166
δ -HCH	86	106	90	122	79	127
Diazinon	110	145	122	153	118	140
Formothion	135	160	126	172	123	168
Clorpirifos-metil	71	150	75	157	78	161
Heptaclor	116	198	113	204	130	222
Fenitrotion	71	106	115	114	120	118
Malation	130	76	122	74	121	66
Aldrin	124	228	102	236	130	238
Heptaclor-epox-a	113	124	97	122	111	126
Heptaclor-epox-b	110	125	92	126	100	126
Metidation	88	131	91	135	117	142
α -Endosulfan	112	144	87	143	102	158
Dieldrin	107	156	93	150	92	152
Endrin	78	124	90	120	72	134
β -Endosulfan	121	130	92	122	106	132
DDD	117	228	90	222	101	192
Endosulfan sulfato	107	124	114	126	95	112
DDT	122	236	121	222	115	204

Tabla 12. Cuantificación de muestras fortificadas (100 ng L^{-1}) por CG-TSD usando patrones en disolvente y en matriz.

Plaguicida	Recuperación (%)					
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Matriz	Disolv.	Matriz	Disolv.	Matriz	Disolv.
Dimetoato	84	77	90	72	80	72
Simazina	81	76	72	75	80	73
Atrazina	101	94	91	88	97	83
Terbutilazina	125	103	127	97	129	90
Diazinon	99	84	93	89	90	78
Clorpirifos-metil	119	97	121	97	124	96
Terbutrina	122	104	110	100	117	105
Pirimifos-metil	95	94	81	97	88	99
Malation	117	71	124	98	125	100
Clorpirifos	108	77	103	87	93	88
Metidation	106	94	113	98	105	101

Como se puede observar, en el sistema ECD las recuperaciones obtenidas con patrones en disolvente son significativamente mayores que las obtenidas con patrones en matriz para la mayoría de los plaguicidas. Así pues, se eligió construir las curvas de calibración usando patrones preparados en matriz para tener en cuenta este hecho. Esto supone la preparación de los patrones de calibración mediante la fortificación de muestras de agua de entrada a las lavadoras (blancos de agua) para proporcionar así el mismo aumento de la señal inducido por la matriz que en los extractos de muestra.

Sin embargo, este efecto matriz no se observa en el sistema TSD. La matriz no suprime o aumenta significativamente la respuesta de este detector puesto que los valores de recuperación obtenidos con ambos tipos de calibración no difieren significativamente. Por esta razón, se puede llevar a cabo una cuantificación exacta cuando se usan patrones preparados en disolvente para calibrar.

✓ CG-MS/MS

Los resultados obtenidos en el estudio de la presencia del efecto matriz se muestran en la Tabla 13. Como se puede observar, no se observan diferencias significativas entre las recuperaciones obtenidas cuando se usan para cuantificar patrones sin matriz o con matriz. Así pues, se concluye que la matriz no suprime o aumenta significativamente la respuesta del detector MS/MS y que se puede llevar a cabo una cuantificación exacta cuando se usan patrones preparados en disolvente para construir las calibraciones.

Tabla 13. Cuantificación de muestras fortificadas (100 ng L^{-1}) por CG-MS/MS usando patrones en disolvente y en matriz.

Plaguicida	Recuperación (%)					
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Matriz	Disolv.	Matriz	Disolv.	Matriz	Disolv.
Diuron	79	72	80	75	77	80
α -HCH	92	89	90	86	92	93
Dimetoato	100	104	103	100	99	102
Simazina	104	96	102	105	102	93
Atrazina	82	78	82	85	87	86
Trietazina	103	99	103	101	99	101
β -HCH	76	75	77	78	77	73
Terbutilazina	85	80	87	76	85	83
δ -HCH	85	88	88	92	88	93
Diazinon	84	82	82	77	79	85
Lindano	95	87	97	90	95	94
Formotion	105	105	105	111	109	112
Clorpirifos-metil	75	72	72	77	75	70
Heptaclor	75	72	75	72	73	75
Carbaril	102	116	104	112	108	115
Pirimifos-metil	82	78	80	84	82	82
Terbutrina	80	77	79	75	80	78
Fenitrotion	80	84	82	86	83	81
Clorpirifos	80	78	80	82	84	83
Aldrin	89	84	85	84	87	89
Heptaclor-epox-a	77	76	80	75	79	72
Heptaclor-epox-b	100	97	102	100	100	102
Folpet	100	99	104	105	100	103
α -Endosulfan	78	76	82	78	82	72
Dieldrin	80	82	80	76	77	75
Endrin	88	84	80	80	85	80
β -Endosulfan	93	90	90	85	90	89
DDD	78	78	80	76	75	73
Endosulfan sulfato	88	87	84	87	88	82
DDT	81	77	79	80	82	81

2.2.4.2 PARÁMETROS ANALÍTICOS

Se determinaron el intervalo lineal y linealidad así como los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) en los tres sistemas cromatográficos para los plaguicidas estudiados. Los resultados se muestran en la Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16.

a) Intervalo lineal y linealidad

El intervalo lineal es una característica de funcionamiento de un método cuantitativo que está muy relacionada con el calibrado del mismo. Se trata de un intervalo de concentración cuya parte central puede ser lineal: relación directa señal-concentración. La delimitación de este intervalo es como sigue:

- Límite inferior: límite de cuantificación (LC)
- Límite superior: impuesto por una combinación de factores característicos del instrumento.

La linealidad mide el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado. Habitualmente, la linealidad se suele deducir a través de la desviación estándar de los residuales ($S_{R,C}$), ó de los coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2).

En el caso del CG-MS/MS, Los coeficientes de correlación de las rectas de calibración son >0.993 en todos los casos, mostrando una linealidad bastante buena del método.

b) Límite de detección y cuantificación

El LD es una característica de funcionamiento del método a validar, especialmente relevante en análisis de trazas. Está directamente relacionado con la sensibilidad del mismo. Se refiere a la concentración de analito más baja que se puede detectar con el método. Hay que tener en cuenta que, en realidad, se trata más de un intervalo que de un solo dato, ya que la probabilidad de detección no cambia bruscamente de 0 a 1 antes y después del LD. La definición de LD más ampliamente aceptada es la concentración del analito que origina una señal que es la suma de la del blanco más tres veces la desviación estándar del mismo.

$$LD = \bar{x}_B + 3S_B$$

donde,

\bar{x}_B = media obtenida con el análisis de 10 blancos de muestra.

S_B = desviación estándar de las 10 determinaciones.

En los métodos cromatográficos se puede obtener el límite de detección a partir del ruido de la señal analítica. La magnitud del ruido se toma como una estimación de la desviación estándar del blanco. En la práctica, la relación señal/ruido (S/N) es proporcionada por el software para el almacenamiento y tratamiento de los datos: Varian Star 5.5 para los sistemas CG-ECD y CG-TSD y Saturn GC/MS Workstation 5.52 para el sistema CG-MS/MS. Así pues, el LD se calcula como el nivel de fortificación más bajo para el cual el analito en concreto es identificado consistentemente con una relación S/N ≥ 3 (y un ajuste espectral, fit ≥ 700 en el caso del sistema CG-MS/MS).

El LC para cada plaguicida también se muestra en las Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16. Se conoce también como límite de determinación y es la concentración más baja de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud (veracidad). Matemáticamente, se define como la concentración de analito a la que le corresponde una señal que es igual al valor medio de la señal del blanco más 5, 6 ó 10 (la más usual) veces de las desviaciones estándar del blanco.

$$LC = \bar{x}_B + 10S_B$$

donde,

\bar{x}_B : media obtenida con el análisis de 10 blancos de muestra.

S_B : desviación estándar de las 10 determinaciones.

Al igual que el LD, en los métodos cromatográficos se puede obtener el LC a partir del ruido de la señal analítica, de tal manera que se calcula como el nivel de fortificación más bajo para el

cual el analito en concreto es identificado consistentemente con una relación S/N ≥ 10 (y un ajuste espectral, fit ≥ 700 en el caso del CG-MS/MS) y una desviación estándar relativa (repetibilidad) $\leq 20\%$ (n=4).

En el sistema CG-TSD y MS/MS los LD y LC se establecieron preparando los patrones en disolvente con concentraciones crecientes de plaguicidas entre 0.5-10 ng L⁻¹ y 0.1-10 ng L⁻¹ para CG-TSD y MS/MS, respectivamente. En CG-ECD fueron preparados fortificando blancos con concentraciones crecientes de plaguicidas oscilando entre 0.5-20 ng L⁻¹.

Tabla 14. Parámetros analíticos de los plaguicidas con el sistema CG-ECD.

No.	Plaguicida	Intervalo lineal (ng L ⁻¹)	r ²	LD (ng L ⁻¹)	LC (ng L ⁻¹)
1	Diuron	10-800	0.997	2	10
2	α-HCH	2-400	0.999	1	2
3	β-HCH	2-800	0.996	1	2
4	Lindano	2-800	0.992	1	2
5	δ-HCH	2-400	0.999	1	2
6	Quintoceno		Patrón interno		
7	Diazinon	4-800	0.995	2	4
8	Formotion	2-800	0.994	1	2
9	Clorpirifos-metil	2-1000	0.997	1	2
10	Heptaclor	4-800	0.997	1	4
11	Fenitroton	2-1000	0.995	1	2
12	Malation	10-3000	0.997	2	10
13	Aldrin	2-400	0.999	1	2
14	Heptaclor-epox-a	2-500	0.997	1	2
15	Heptaclor-epox-b	2-500	0.997	1	2
16	Metidation	10-500	0.991	2	10
17	α-Endosulfan	2-800	0.997	1	2
18	Dieldrin	4-500	0.998	2	4
19	Endrin	4-1000	0.997	2	4
20	β-Endosulfan	2-800	0.998	1	2
21	DDD	2-500	0.988	1	2
22	Endosulfan sulfato	2-800	0.998	1	2
23	DDT	10-500	0.994	4	10

Tabla 15. Parámetros analíticos de los plaguicidas con el sistema CG-TSD.

No.	Plaguicida	Intervalo lineal (ng L ⁻¹)	r ²	LD (ng L ⁻¹)	LC (ng L ⁻¹)
1	Dimetoato	3-400	0.998	1	3
2	Simazina	3-400	0.997	1	3
3	Atrazina	3-400	0.999	1	3
4	Terbutilazina	3-400	0.998	1	3
5	Diazinón	3-400	0.998	1	3
6	Cafeína		Patrón interno		
7	Clorpirifos-metil	3-400	0.999	1	3
8	Terbutrina	3-300	0.998	1	3
9	Pirimifos-metil	3-300	0.998	3	5
10	Malatión	3-300	0.999	1	3
11	Clorpirifos	3-500	0.999	1	3
12	Metidatión	3-300	0.999	1	3

Tabla 16. Parámetros analíticos de los plaguicidas con el sistema CG-MS/MS.

No.	Plaguicida	Intervalo lineal (ng L ⁻¹)	r ²	LD (ng L ⁻¹)	LC (ng L ⁻¹)
1	Diuron	2-2000	0.999	0.5	2
2	α-HCH	0.5-2000	0.999	0.3	0.5
3	Dimetoato	5-500	0.996	2	5
4	Simazina	2-2000	0.998	0.5	2
5	Atrazina	2-500	0.997	0.5	2
6	Trietazina	3-500	0.995	1.0	3
7	β-HCH	0.5-1500	0.999	0.2	0.5
8	Terbutilazina	1-500	0.997	0.5	1
9	δ-HCH	1-500	0.999	0.5	1
10	Diazinon	5-1500	0.998	2	5
11	Lindano	0.5-2000	0.999	0.2	0.5
12	Formotion	10-2000	0.990	5	10
13	Clorpirifos-metil	1-1500	0.999	0.5	1
14	Heptaclor	1-2000	0.998	0.5	1
15	Carbaril	5-2000	0.997	1	5
16	Pirimifos-metil	2-2000	0.998	0.5	2
17	Terbutrina	5-1000	0.999	1	5
18	Fenitroton	3-1000	0.994	1	3
19	Clorpirifos	0.5-1000	0.999	0.2	0.5
20	Aldrin	1-2000	0.993	0.5	1
21	Heptaclor-epox-a	1-1500	0.995	0.5	1
22	Heptaclor-epox-b	2-2000	0.997	1	2
23	Folpet	10-200	0.998	5	10
24	α-Endosulfan	5-2000	0.993	1	5
25	Dieldrin	0.5-2000	0.990	0.2	0.5
26	Endrin	3-2000	0.998	1	3
27	β-Endosulfan	5-2000	0.999	2	5
28	DDD	0.5-1500	0.998	0.2	0.5
29	Endosulfan	5-2000	0.994	1	5
30	DDT	1-1500	0.996	0.5	1

2.2.4.3 REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y ESTUDIO DE RECUPERACIÓN

Se evaluó la repetibilidad de las determinaciones cromatográficas mediante el análisis de diez inyecciones sucesivas, obteniéndose valores satisfactorios como se puede comprobar en la Tabla 18. La precisión de los métodos analíticos (reproducibilidad) también se determinó mediante los valores de RSD de análisis independientes de tres muestras de agua fortificadas en días diferentes, obteniéndose valores comprendidos entre 2-26, 2-18 y 4-19 % para los sistemas ECD, TSD y MS/MS, respectivamente. La reproducibilidad obtenida para los métodos analíticos propuestos se considera altamente satisfactoria.

Los estudios de recuperación se llevaron a cabo para cada uno de los tres métodos propuestos por triplicado, analizando blancos fortificados con una concentración de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los plaguicidas. Estas muestras se cuantificaron usando los procedimientos de calibración descritos anteriormente. Los resultados se muestran también en la Tabla 18. En todos los casos los métodos propuestos proporcionaron valores próximos a las concentraciones reales, estando los valores de recuperación comprendidos entre 75-128, 74-103 y 70-121% para los sistemas ECD, TSD y MS/MS, respectivamente.

Tabla 17. Repetibilidad, reproducibilidad y exactitud de los métodos propuestos.

Plaguicida	Repetibilidad (%RSD)			Reproducibilidad (%RSD)			Recuperación (%)		
	ECD	TSD	MS/MS	ECD	TSD	MS/MS	ECD	TSD	MS/MS
Diuron	6		5	13		11	102		71
α -HCH	3		6	7		9	119		85
Dimetoato		4	3		4	4		74	102
Simazina		1	11		2	18		75	94
Atrazina		5	8		6	17		88	83
Trietazina			3			5			102
β -HCH	2		4	3		6	98		76
Terbutilazina		5	9		7	13		97	79
δ -HCH	3		3	16		5	96		88
Diazinon	4	8	10	5	7	19	117	84	80
Lindano	3		7	7		10	85		87
Formotion	5		9	5		13	128		109
Clorpirifos-metil	3	5	6	5	5	11	75	97	70
Heptaclor	5		2	8		5	120		71
Carbaril			4			6			121
Pirimifos-metil		2	13		3	17		97	77
Terbutrina		6	3		3	5		103	75
Fenitrotion	4		14	26		16	102		81
Clorpirifos		5	5		7	4		84	80
Metidati3n	11	2		16	4		99	98	
Malati3n	6	13		4	18		124	90	
Aldrin	6		5	12		8	118		82
Heptaclor-epox-a	7		7	8		6	107		75
Heptaclor-epox-b	6		6	9		8	101		96
Folpet			2			4			98
α -Endosulfan	8		3	13		5	106		74
Dieldrin	9		5	9		7	97		78
Endrin	9		5	11		9	80		79
β -Endosulfan	11		4	14		6	106		89
DDD	12		5	13		6	103		76
Endosulfan sulfato	6		6	9		8	105		85
DDT	2		8	3		10	119		74

Los métodos propuestos se aplicaron a la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de agua de lavado de aceituna procedentes de almazaras de la provincia de Jaén. Los resultados de estas determinaciones se discutirán posteriormente en los apartados dedicados al estudio de la influencia del lavado de la aceituna.

2.3 Método de determinación de herbicidas en suelo y lodo

Los resultados obtenidos en el análisis de agua de lavadoras (como se indica en apartados posteriores) muestran que las aguas que presentan mayores niveles de residuos tienen también un alto contenido en lodos. Esto es debido a la tierra que acompaña a la aceituna y que se introduce con ellas en las lavadoras. Por ello, se ha desarrollado un método analítico para el análisis de herbicidas en suelo que permite también llevar a cabo la determinación en lodos de las lavadoras. Los herbicidas seleccionados (en base a su amplio uso en el olivar) son cuatro triazinas: atrazina, simazina, terbutilazina y terbutrina así como una fenilurea: diuron.

2.3.1 Tratamiento previo de la muestra

Las muestras de lodo se obtienen mediante la filtración de las muestras de agua procedentes de las lavadoras de aceituna. Estas muestras de lodo se secan en los filtros a 50°C durante una noche. Posteriormente se pulveriza y se tamiza hasta un tamaño de grano de 2 mm.

2.3.2 Procedimiento de extracción y clean-up

Se ha desarrollado un método de extracción de plaguicidas basado en una extracción con disolvente asistido por ultrasonidos. Se ha evaluado la influencia de tres parámetros: la naturaleza del disolvente, tiempo de extracción y volumen de este disolvente. El estudio de la influencia del volumen de disolvente y tiempo de extracción se llevó a cabo por duplicado para dos niveles de fortificación: 10 y 100 ng g⁻¹. En ambos casos se analizaba un blanco de suelo con cada conjunto de muestras. Para la preparación de muestras fortificadas se siguió el siguiente procedimiento: 5 g de suelo se fortifican mediante la adición del volumen correspondiente de multipatrón de herbicidas para conseguir una concentración final de 10 ng g⁻¹ o 100 ng g⁻¹. Para asegurar que los herbicidas se distribuyen bien, se añade una pequeña

cantidad de acetona al multipatrón para humedecer el suelo y después se agita cuidadosamente. La muestra se mantiene en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente para que el disolvente se evapore.

Debido a las diferentes propiedades de los herbicidas estudiados se probaron disolventes con un diferente intervalo de polaridad. El mejor resultado se obtuvo usando acetona/ciclohexano 1:3 (V:V).

Las experiencias llevadas a cabo con diferentes tiempos de sonicación revelaron que 20 minutos eran suficientes para obtener unos buenos valores de recuperación.

También se probaron diferentes volúmenes de disolvente para la extracción. Como se puede observar en la Figura 63, los valores de recuperación para las triazinas no se veían significativamente afectados por esta variable. Sin embargo, la recuperación del diuron era mayor cuando se usaba 40 mL de extractante para un nivel de fortificación de 100 ng g^{-1} . Estos resultados eran iguales para los dos niveles de fortificación estudiados y así pues, se escogió 40 mL como el volumen de disolvente extractante óptimo para las siguientes experiencias.

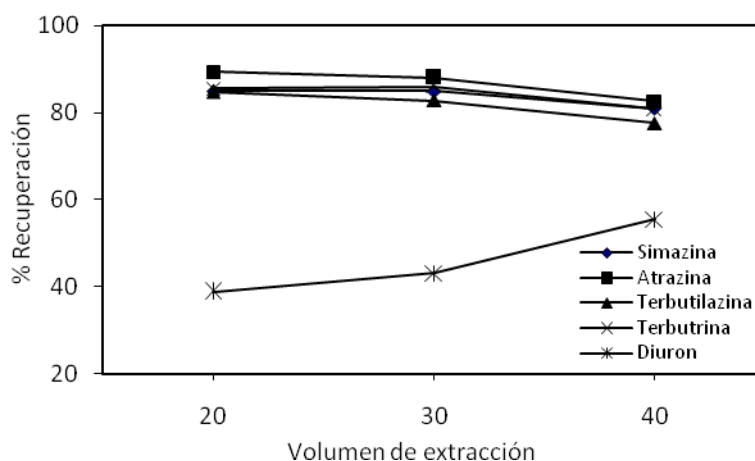


Figura 63. Influencia del volumen de mezcla extractante sobre la recuperación para un nivel de fortificación de 100 ng g^{-1} .

Una vez optimizadas las variables se puede resumir el procedimiento de extracción como sigue: las muestras de suelo y lodos se extraen con 40 mL de una mezcla de ciclohexano/acetona (3:1) durante 20 minutos en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente. Los extractos se filtran a vacío a través de papel de filtro con un tamaño de poro de 8 μm y después se pasan a través de filtros de membrana de 0.45 μm para eliminar el material en suspensión hasta que los extractos quedan transparentes. Finalmente, los extractos se secan con Na_2SO_4 anhidro y se lleva a sequedad en un rotavapor.

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de lodos (residuo procedente de la filtración de agua de lavadoras de aceituna) es necesario una etapa adicional que permita eliminar los restos de aceite que quedan en el extracto después de de ser filtrado y secado con Na_2SO_4 anhidro.

Se probaron diferentes procesos de clean-up, uno de ellos basado en el uso de cartuchos de gel de sílice C_{18} y la elución con diclorometano como ha sido previamente descrito por Mottaleb y colab.⁸⁵ y Möder y colab.⁸⁸. Sin embargo, después de terminar el proceso se observaba un residuo oleoso en el matraz una vez que el disolvente se evaporaba en el rotavapor. Otro de los procesos de clean-up que se probó estaba basado en el desarrollado por Lentza-Rizos y colab.²⁰, consistente en una precipitación de la fracción lipídica del extracto mediante congelación a -18°C para separarla del disolvente en el cual los herbicidas están disueltos. Este proceso no sirvió para eliminar los interferentes que acompañaban a los herbicidas ya que en los cromatogramas se observaba mucho ruido y era difícil la cuantificación.

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando alúmina, un material adsorbente también utilizado por Lentza-Rizos y colab.¹⁰⁵ para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite con el fin de eliminar restos de grasa en los extractos. El extracto de lodo se aplica a la columna y después se eluye. Se probaron diferentes disolventes (ciclohexano, acetona, éter de

petróleo, diclorometano) y volúmenes y los mejores resultados se obtuvieron eluyendo con 10 mL de una mezcla acetona/ciclohexano (1:3) seguido por 30 mL de diclorometano.

Después de la optimización de las variables, el proceso de clean-up para las muestras de lodo se puede resumir como sigue: se empaqueta una columna cromatográfica (20 cm x 8 mm d.i.) con 6 g de alúmina activada suspendida en ciclohexano. La columna se lava con 20 mL de ciclohexano, se aplica el extracto de la muestra de lodo y se eluye con 10 mL de una mezcla de ciclohexano/acetona (3:1) seguido por 30 mL de diclorometano. Por último, el eluato se lleva a sequedad en un rotavapor.

En ambos casos, el residuo se redisuelve añadiendo el volumen correspondiente de patrón interno (100 μL de una disolución $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de quintoceno para el sistema ECD y 200 μL de una disolución $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cafeína para el TSD) y ciclohexano hasta un volumen final de 1 mL. El extracto se transfiere a un vial de 2 mL para su posterior análisis cromatográfico.

2.3.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación

La Figura 64 y Figura 65 muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra de suelo fortificado y un blanco de suelo con los dos detectores empleados.

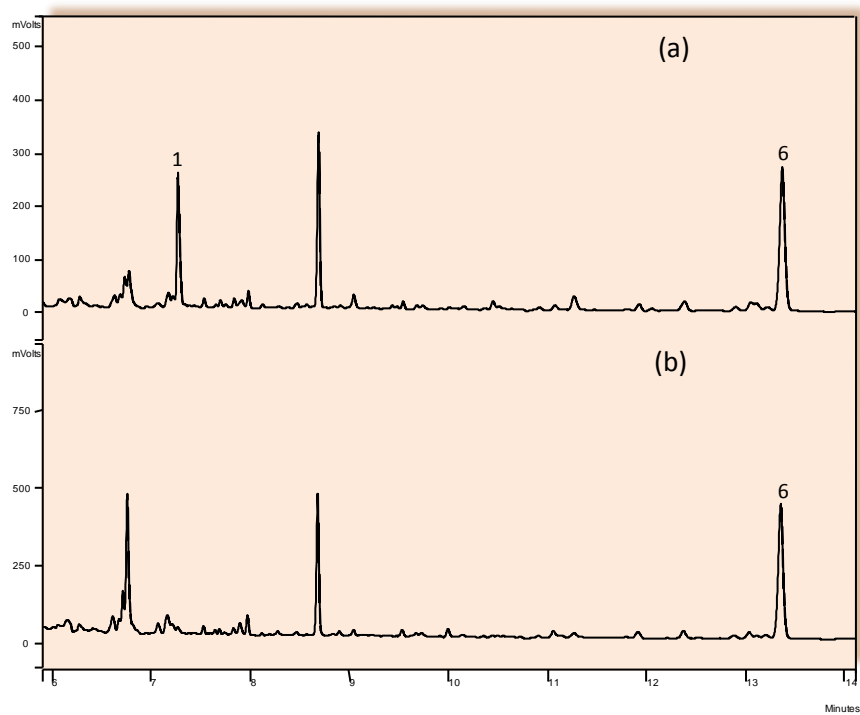


Figura 64. Cromatograma CG-ECD: (a) una muestra de suelo fortificada a un nivel de 100 ng g^{-1} y (b) blanco.

1: diuron. 6: quintoceno.

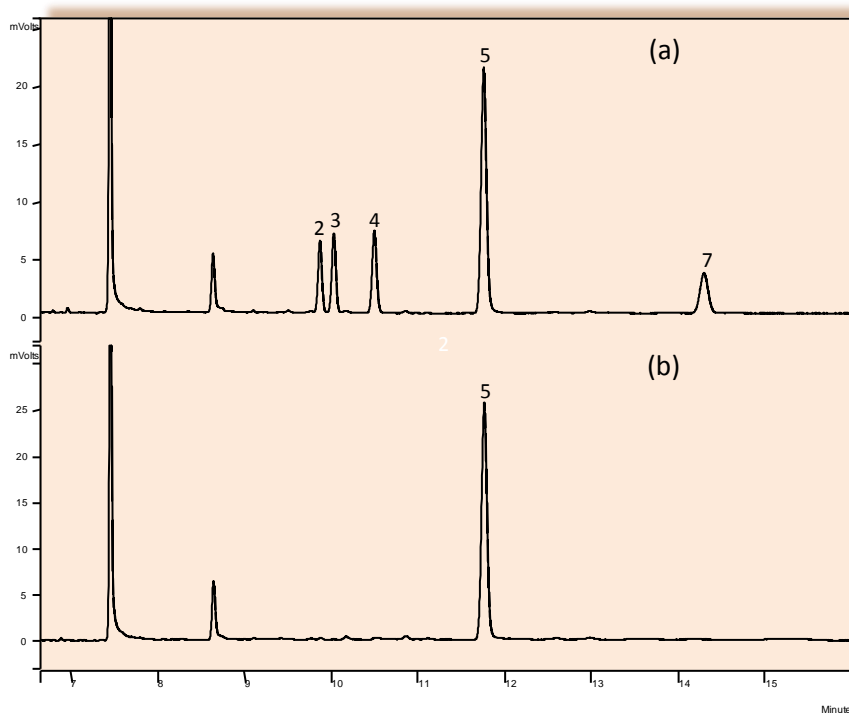


Figura 65. Cromatograma CG-TSD: (a) una muestra de suelo fortificada a un nivel de 100 ng g^{-1} y (b) blanco

2: simazina. 3: atrazina. 4: terbutilazina. 5: cafeína. 7: terbutrina.

Como se puede observar, se produce una buena separación de los analitos, lo cual facilita su cuantificación.

La identificación de los herbicidas se produce en base a sus tiempos de retención, comparándolos con los de los patrones por separado en disolvente. La cuantificación se lleva a cabo mediante el método del patrón interno, utilizando quintoceno y cafeína para los sistemas ECD y TSD, respectivamente.

2.3.4 Validación de los métodos cromatográficos

2.3.4.1 CALIBRACIÓN

Se ha llevado a cabo una comparación entre las rectas de calibración obtenidas con patrones preparados en disolvente o fortificando blancos de suelo. Las diferencias en las pendientes de estas rectas de calibrado muestran la presencia de efecto matriz para todos los herbicidas, aunque es más acusado en el caso del diuron, como se puede observar en la Figura 66.

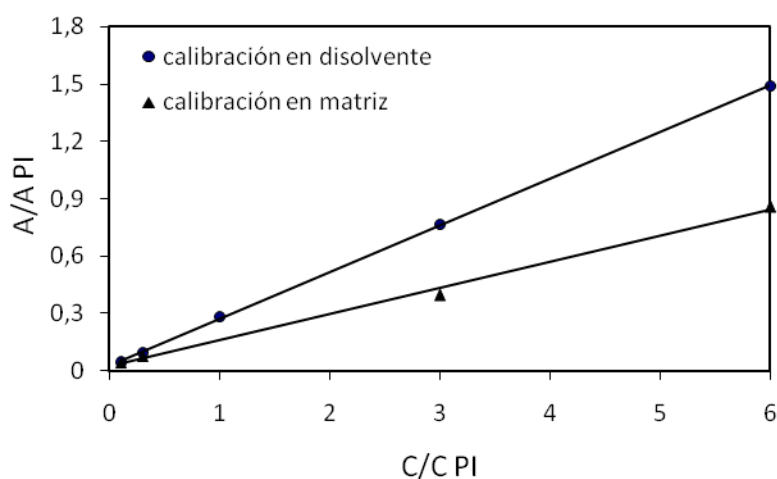


Figura 66. Rectas de calibración para el diuron, preparadas con patrones en disolvente y en matriz.

$A/A PI$ = área del pico del herbicida/área del pico del patrón interno
 $C/C PI$ = concentración del herbicida/concentración del patrón interno

Por tanto, y debido a la presencia de efecto matriz, los patrones de calibración se prepararon fortificando blancos de suelo y aplicando el procedimiento de extracción descrito anteriormente para obtener los extractos de matriz fortificada.

De esta forma, los patrones de calibración pasan por el mismo proceso que las muestras y así se minimiza la influencia de posibles pérdidas en las recuperaciones de las muestras durante el proceso de extracción.

2.3.4.2 PARÁMETROS ANALÍTICOS

La Tabla 18 muestra los tiempos de retención y parámetros analíticos de los herbicidas en estudio. Se observa una buena linealidad de los herbicidas seleccionados, con coeficientes de correlación comprendidos entre 0.995 y 0.999.

Tabla 18. Tiempos de retención y datos de calibración para los herbicidas y patrones internos

No.	Herbicida	t_R (min)	Intervalo lineal ($ng\ g^{-1}$)	r^2	LD ($ng\ g^{-1}$)	LC ($ng\ g^{-1}$)
1	Diuron	7.267	2-160	0.995	1.4	2
2	Simazina	9.849	1.4-120	0.997	0.2	1.4
3	Atrazina	10.012	1.4-120	0.997	0.8	1.4
4	Terbutilazina	10.474	2-120	0.998	0.2	2
5	Cafeína	11.736	-	-	-	-
6	Quintoceno	13.347	-	-	-	-
7	Terbutrina	14.262	2-120	0.999	1.4	2

Los LD y LC de los herbicidas, calculados como el nivel de fortificación más bajo para el cual eran identificados consistentemente con una $S/N \geq 3$ (LD) ó ≥ 10 (LC) también se muestran en la Tabla. Se establecieron fortificando blancos de suelo con concentraciones decrecientes de herbicidas entre 2 y 0.1 $ng\ g^{-1}$. Los límites de detección están comprendidos entre 0.2 $ng\ g^{-1}$ (para simazina y terbutilazina) y 1.4 $ng\ g^{-1}$ (para diuron y terbutrina) mientras que los límites de cuantificación varían entre 2 y 1.4 $ng\ g^{-1}$. Como se puede comprobar, el detector TSD presenta una sensibilidad menor que el ECD, pero también una mayor selectividad, y este hecho permite que se alcancen LD muy bajos para las triazinas, debido a la línea base regular que se obtiene y a la ausencia de interferencias alrededor de los tiempos de retención de los analitos. La cuantificación de diuron con ECD se hizo más difícil debido a la presencia de algunos picos interferentes en la región de interés y esta es la razón por la que el LD del diuron está en el mismo intervalo que las triazinas, aunque el ECD sea más sensible.

2.3.4.3 REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y ESTUDIO DE RECUPERACIÓN

La precisión del análisis cromatográfico se estableció con la desviación estándar relativa (RSD) obtenida inyectando muestras de suelo fortificadas a dos niveles de fortificación, diez veces consecutivas. Estos valores también se muestran en la Tabla 19 y varían entre 5.1-10.5% y 2.3-10.4% para los niveles de fortificación de 10 y 100 ng g⁻¹, respectivamente. Estos valores indican una precisión muy buena, especialmente considerando que las inyecciones se realizaban manualmente.

Tabla 19. Valores de repetibilidad, reproducibilidad y recuperación.

Herbicida	Repetibilidad (% RSD)		Reproducibilidad (% RSD)		Recuperación*	
	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	Suelo	Lodos
Diuron	6.2	10.4	26.7	17.8	109.3	69.5
Simazina	6.9	2.3	12.7	8.5	97.6	97.5
Atrazina	10.5	4.6	7.5	10.1	100.3	81.0
Terbutilazina	5.1	3.0	13.9	13.0	100.7	123.0
Terbutrina	6.3	3.5	32.3	10.7	95.3	83.8

*Nivel de fortificación: 100 ng g⁻¹.

Se evaluó la reproducibilidad del método analítico en muestras de suelo utilizando los datos obtenidos en un estudio que se realizó sobre la evolución de los residuos de herbicidas añadidos a muestras de suelo exenta de los mismos. Se pretendía comprobar si había diferencia significativa entre las recuperaciones de residuos cuando éstos están recién añadidos ó cuando ha pasado el tiempo. Este proceso se conoce como "ageing" y en él se pone de manifiesto si el compuesto se une al suelo más fuertemente a lo largo del tiempo⁹⁰. Se hicieron cinco análisis de cada muestra fortificada a lo largo de tres semanas. Los valores de recuperación de todos los herbicidas no diferían significativamente de los obtenidos cuando se acababa de fortificar la muestra. Así pues, como se puede observar, los datos de reproducibilidad obtenidos son excelentes, con valores de RSD comprendidos entre 10-15% excepto para diuron y terbutrina para el nivel de fortificación más bajo.

Se llevó también a cabo un estudio de recuperación tanto en suelo como en lodo para establecer la exactitud del método propuesto. Los resultados obtenidos para un nivel de fortificación de 100 ng g^{-1} se muestran también en la Tabla 19. Para las muestras de suelo se obtuvieron excelentes valores de recuperación, oscilando entre 95.3-109.3%. En el caso de los lodos, se obtuvieron valores satisfactorios para todos los herbicidas excepto para el diuron, cuyo valor de recuperación era bajo, pero aun así aceptable.

2.3.5 Comparación entre UASE y MASE

Debido al creciente interés que la MASE (Microwave Assisted Solvent Extraction, extracción con disolvente asistida con microondas) ha despertado en los últimos años para la extracción de micronutrientes orgánicos en matrices sólidas, se ha llevado a cabo un estudio para comparar la eficiencia de esta técnica con respecto a la extracción con disolvente asistida por ultrasonidos (UASE, Ultrasonic Assisted Solvent Extraction).

En este estudio se añadieron 40 mL de la mezcla acetona/ciclohexano, 1:3 (V:V) a los vasos recipientes MASE, los cuales contenían 5 g de suelo fortificado (100 ng g^{-1}). La extracción se llevó a cabo durante 20 min a un 50% de la potencia del instrumento (475 W) con un límite de presión de 690 KPa y un límite de temperatura de 60°C . Simultáneamente, se llevó a cabo la extracción de 5 g de suelo fortificado (100 ng g^{-1}) con el baño de ultrasonidos y con las condiciones óptimas que se habían seleccionado anteriormente.

Los valores de recuperación obtenidos se compararon y están representados en la Figura 67.

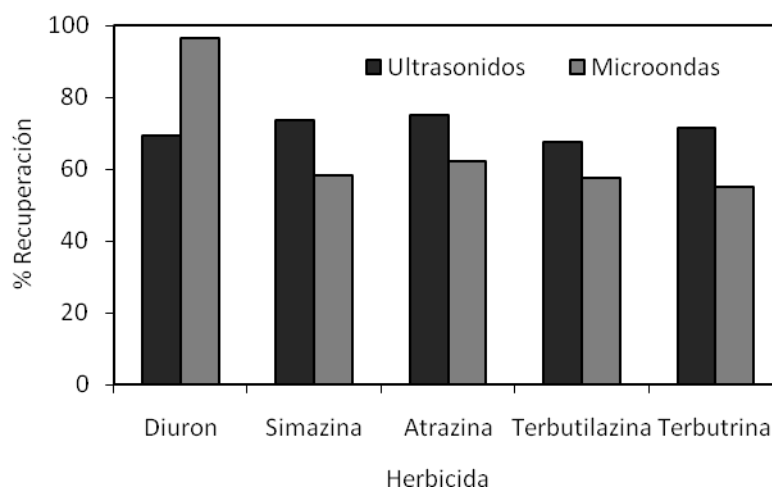


Figura 67. Comparación de las recuperaciones obtenidas con UASE y MASE.

Como se puede observar en esta figura, los valores de recuperación usando UASE son mayores que los que se obtienen usando MASE, probablemente debido a la degradación térmica de los herbicidas. El diuron es una excepción, pero el alto valor de recuperación que se obtiene se debe posiblemente a una sobreestimación en su cuantificación debido a la coelución de interferencias extraídas cuando se usa MASE.

El método propuesto se aplicó a una serie de muestras de lodos procedentes del filtrado de aguas de lavadoras de aceituna y los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados del análisis de lodos (ng g^{-1}) de lavadoras de aceituna: (1) aceituna de suelo (muestras 1-16) y (2) aceituna sin separar (muestras 17 y 18).

Nº muestra	Herbicida				
	Diuron	Simazina	Atrazina	Terbutilazina	Terbutrin
1	105.4	<LC	ND	198.0	ND
2	31.2	ND	ND	LC	ND
3	230.5	ND	ND	1319.5	ND
4	102.1	ND	ND	460.3	ND
5	69.5	ND	ND	1031.4	ND
6	36.1	ND	ND	7.0	ND
7	8.7	ND	ND	679.8	ND
8	53.1	<LC	ND	530.7	ND
9	2.8	<LC	ND	50.9	ND
10	91.6	ND	ND	275.8	ND
11	88.4	ND	ND	118.3	ND
12	82.9	ND	ND	13.2	ND
13	401.3	ND	ND	32.7	ND
14	130.9	ND	ND	ND	ND
15	205.6	ND	ND	ND	ND
16	210.6	ND	ND	8.6	ND
17	18.9	7.6	ND	575.0	ND
18	15.5	ND	ND	46.4	ND

ND: No detectado.

LC: Límite de cuantificación.

Como se puede observar, los herbicidas que se detectan en las muestras de lodos son el diurón y la terbutilazina, que son dos de los herbicidas que habitualmente se aplican en el olivar. Los niveles de concentración que se han detectado son muy variables, oscilando entre 2.8 y 401.3 ng g^{-1} para diuron y entre 7.0 y 1319.5 ng g^{-1} para terbutilazina.

2.4 Método de determinación de plaguicidas en aceite

2.4.1 Tratamiento previo de la muestra.

Las muestras de aceite son filtradas a través de Na_2SO_4 anhidro si se observa alguna turbidez debido a la presencia de agua.

2.4.2 Procedimiento de extracción y clean-up

Se ha desarrollado un proceso de limpieza de las muestras de aceite para eliminar los lípidos y los compuestos de mayor masa molecular y separar así la fracción que contiene los plaguicidas. Dicho proceso está basado en el empleo de cromatografía de permeación en geles (GPC). En las primeras experiencias, las muestras de aceite se disolvieron en diclorometano, disolvente que se usó también como fase móvil tal y como había sido descrito previamente por Gelsomino y colab.¹¹⁰. Sin embargo, se observó que el uso de diclorometano provocaba la degradación de las columnas de GPC, reduciendo considerablemente su tiempo de vida. Por consiguiente, la fase móvil del sistema GPC se sustituyó por una mezcla acetato de etilo-ciclohexano (1:1)⁵⁵, con un caudal de 5.0 mL min⁻¹. Se estableció asimismo un caudal mínimo de 0.5 mL min⁻¹ entre las secuencias de muestras para limpiar el sistema GPC y evitar que las columnas se sequen. También se sustituyó la inyección directa del aceite de oliva disuelto en diclorometano por una extracción líquido-líquido previa con acetonitrilo saturado en n-hexano¹⁰¹, tanto para prevenir la degradación de las columnas de GPC como para mejorar la eficiencia del proceso de clean-up. Así, la separación de los plaguicidas de baja masa molecular de la fracción lipídica de mayor masa molecular es más eficiente, evitando la coelución entre ellas.

El proceso se puede resumir como sigue: Se añaden 200 µL de patrón de recuperación (TPP) con una concentración de 1 µg mL⁻¹ a 2 g de muestra de aceite de oliva y la mezcla se disuelve en 10 mL de n-hexano saturado en acetonitrilo. La disolución se transfiere a un embudo de separación donde se extrae tres veces con 10 mL de acetonitrilo saturado en n-hexano. Se juntan los extractos en un matraz esférico y se lleva a sequedad en un rotavapor con un baño de agua a 50°C. El residuo se disuelve en 10 mL de fase móvil (acetato de etilo-ciclohexano, 1:1) y se transfiere a un vial de 10 mL de donde se inyectan 5 mL del extracto en el GPC mediante el muestreador automático. El eluato se recoge en la fracción de 15-20 min en tubos colectores. Esa fracción se transfiere a un matraz esférico y se lleva a sequedad en el rotavapor. El residuo se redissuelve añadiendo el volumen adecuado de patrón interno (100 µL

de quintoceno $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el sistema ECD y $200 \mu\text{L}$ de cafeína $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el TSD) y volumen correspondiente de ciclohexano hasta llegar a un volumen final de 1 mL . El extracto se transfiere a un vial de 2 mL para el análisis cromatográfico.

Los patrones preparados en matriz se preparan de manera similar a las muestras pero fortificando previamente un blanco de aceite con la cantidad apropiada de multipatrón de plaguicidas.

2.4.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación

El principal problema en este tipo de análisis fue resolver los picos de los plaguicidas de las especies de la matriz de la muestra que coeluyen y que son posibles interferentes. Por ello, se compararon los cromatogramas correspondientes a un patrón preparado en matriz con los correspondientes blancos de aceite de oliva, mediante los tres detectores propuestos, para establecer la presencia de picos interferentes.

✓ CG-ECD/TSD

La **Figura 68** y **Figura 69** muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra de aceite de oliva blanco fortificado con $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ de plaguicidas y analizada por ECD y TSD. Como se puede observar, en general se obtiene una separación satisfactoria aunque se observan los mismos problemas de solapamiento que se han comentado anteriormente en el método de determinación de plaguicidas en agua.

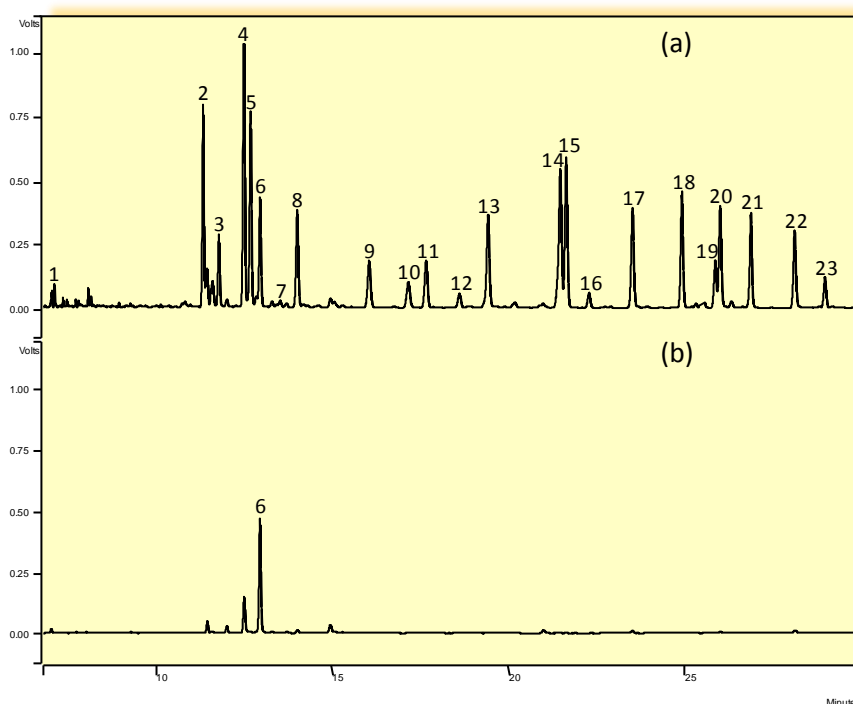


Figura 68. Cromatograma GC-ECD correspondiente a: (a) blanco de aceite fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceite de oliva virgen.

El número de cada plaguicida en las figuras es el que se corresponde con la Tabla 10. Surgieron algunos problemas en el caso del sistema ECD al obtener algunas interferencias de matriz en el blanco de aceite como en el caso del lindano (4). Este positivo aparente no fue confirmado por MS/MS así que no correspondía a la presencia de este plaguicida en el blanco sino a un compuesto de la matriz que eluye justo en el tiempo de retención del lindano. Este hecho hacía imposible su cuantificación puesto que el positivo en el blanco era muy grande y la señal en la muestra saturaba el detector.

En el caso del sistema TSD no se observan interferencias de la matriz, debido a su alta selectividad si se compara con el ECD (**Figura 69**).

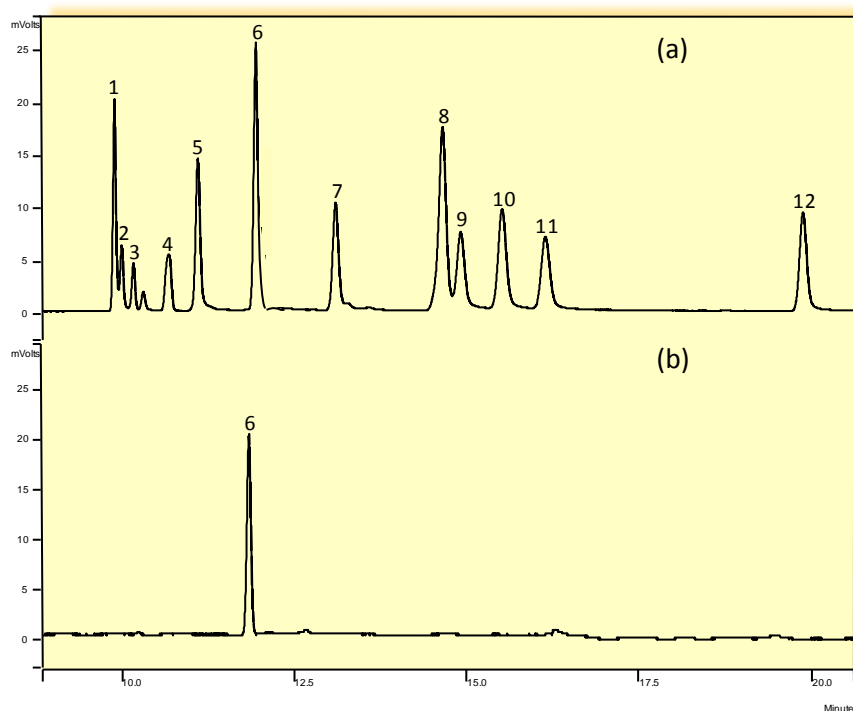


Figura 69. Cromatograma GC-TSD correspondiente a: (a) blanco de aceite fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceite de oliva virgen.

Cuando se encuentra un positivo en una muestra la identificación se lleva a cabo comparando los tiempos de retención de los analitos en la muestra con los de los analitos en los patrones, teniendo que estar dentro del margen ± 0.5 s.

La cuantificación se lleva a cabo mediante el método del patrón interno, con quintoceno y cafeína como patrones internos para los sistemas CG-ECD y TSD, respectivamente.

✓ CG-MS/MS

La Figura 70 muestra el cromatograma correspondiente a una muestra de aceite de oliva blanco fortificado con $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ de plaguicidas.

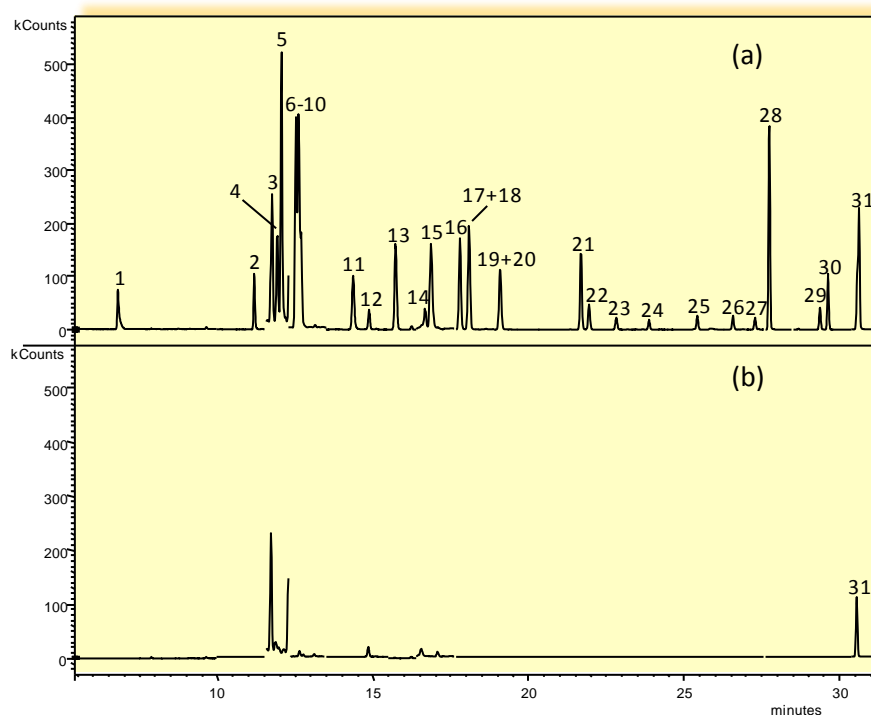


Figura 70. Cromatograma GC-MS/MS (Corriente iónica total, TIC) correspondiente a: (a) blanco de aceite fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceite de oliva.

En general, en el caso del CG-MS/MS, no se observaron picos interferentes debido al bajo fondo originado por el aislamiento de un solo ión y su posterior fragmentación.

Sólo se observa un pico en el blanco de aceite cerca del tiempo de retención del dimetoato (3). La Figura 71 muestra la monitorización MS/MS de dimetoato (m/z 79) en un blanco de aceite y en un blanco de aceite fortificado. El espectro de masas obtenido para cada pico también se muestra en la Figura.

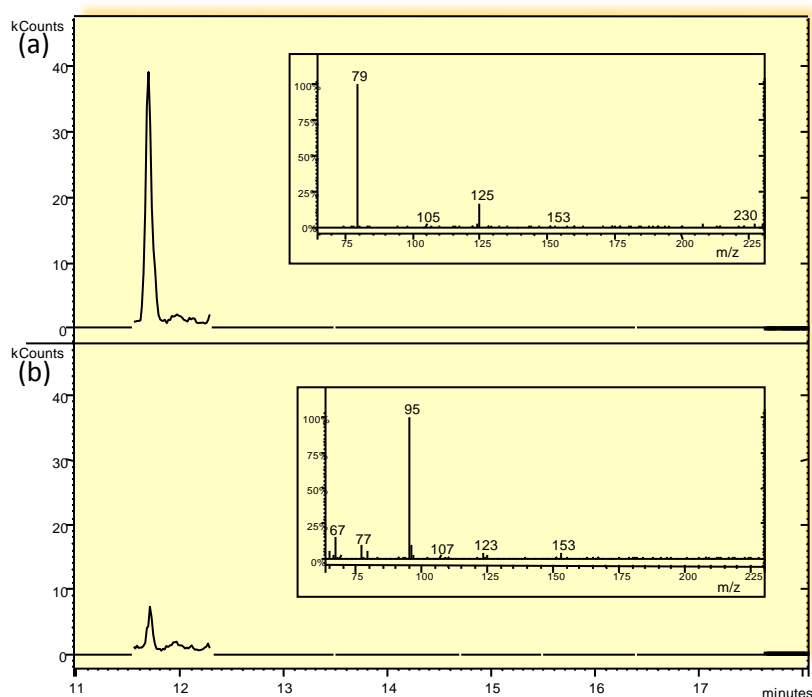


Figura 71. Monitorización MS/MS del dimetoato (m/z 79) en: (a) blanco de aceite fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceite. Interior: Espectros de masas correspondientes.

Cuando se comparan los espectros de masas correspondientes a cada pico se comprueba que no coinciden, apenas se observa el fragmento m/z 79 correspondiente al dimetoato en el blanco de aceite. El fragmento mayoritario es el 95 y este hecho hace que esta especie que coeluye no interfiera en la cuantificación del dimetoato.

En general, todos los plaguicidas se pueden cuantificar sin problemas a excepción de los plaguicidas organofosforados malatión y metidatión, debido a su mala respuesta utilizando EI como modo de ionización. En estas condiciones la ionización química (CI) podría dar mejores resultados, pero implicaría una segunda inyección para cada análisis pues se requiere un tiempo mínimo (15-20 s) para cambiar de un modo de ionización a otro. Así pues, se rechazó esta opción ya que estos plaguicidas se podían determinar por CG-ECD/TSD sin ningún problema.

Los criterios de confirmación de la identidad de los resultados positivos son los mismos que los descritos en el método desarrollado para el análisis de plaguicidas en agua. Asimismo, el análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante el método del patrón externo.

2.4.4 Validación de los métodos cromatográficos

2.4.4.1 CALIBRACIÓN

✓ CG-ECD/TSD

Para establecer si era necesario llevar a cabo una calibración en matriz, se compararon las calibraciones preparadas con patrones en disolvente y en matriz. La respuesta relativa de los patrones en disolvente es bastante mayor que la que se obtiene con patrones preparados en matriz debido a la presencia de trazas de grasa en el extracto final y las posibles pérdidas durante el proceso de preparación de la muestra. Este efecto podría conducir a errores en la cuantificación cuando ésta se lleva a cabo con patrones preparados en disolvente. Por esta razón se eligió calibrar con patrones preparados en matriz.

Se llevaron a cabo calibraciones midiendo el área del pico relativa a la del patrón interno (quintoceno y cafeína para los sistemas ECD y TSD, respectivamente).

✓ CG-MS/MS

En este caso, también se llevó a cabo una comparación entre las calibraciones preparadas con patrones en disolvente y en matriz. Al igual que para los sistemas ECD y TSD, la respuesta relativa de los patrones en disolvente es mayor que la que se obtiene con patrones preparados

en matriz y por ello también se eligió realizar las calibraciones con patrones preparados en matriz.

A diferencia de los sistemas ECD y TSD, no se usó patrón interno debido a la buena reproducibilidad de la inyección (uso del muestreador automático).

2.4.4.2 PARÁMETROS ANALÍTICOS

Para los plaguicidas estudiados se determinaron el intervalo lineal y linealidad así como los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) en los tres sistemas cromatográficos.

✓ CG-ECD/TSD

Como se puede observar en la Tabla 21 y Tabla 22, se consigue una buena linealidad hasta los 1000-2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabla 21. Parámetros analíticos para los plaguicidas con el sistema CG-ECD.

Nº	Plaguicida	Intervalo lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	Diuron	20-2000	0.999	10	20
2	α -HCH	5-1000	0.998	2	5
3	β -HCH	5-1500	0.992	1	5
4	Lindano				
5	δ -HCH	5-1000	0.999	1	5
6	Quintoceno		Patrón interno		
7	Diazinon	20-2000	0.997	5	20
8	Formotion	10-1500	0.993	2	10
9	Clorpirifos-metil	5-1500	0.992	2	5
10	Heptacloro	10-2000	0.997	3	10
11	Fenitrotion	5-2000	0.992	2	5
12	Malation	15-2000	0.998	5	15
13	Aldrin	3-2000	0.994	1	3
14	Heptaclor-epox-a	2-1500	0.999	0.5	2
15	Heptaclor-epox-b	2-1500	0.999	0.5	2
16	Metidation	20-1500	0.996	10	20
17	α -Endosulfan	10-2000	0.995	5	10
18	Dieldrin	2-2000	0.996	0.5	2
19	Endrin	2-1500	0.997	0.5	2
20	β -Endosulfan	5-2000	0.996	2	5
21	DDD	2-2000	0.996	0.5	2
22	Endosulfan sulfato	5-2000	0.996	2	5
23	DDT	20-1500	0.999	10	20

Tabla 22. Parámetros analíticos para los plaguicidas con el sistema CG-TSD.

No.	Plaguicida	Intervalo Lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	Dimetoato	10-1500	0.994	5	10
2	Simazina	20-2000	0.997	10	20
3	Atrazina	20-2000	0.998	10	20
4	Terbutilazina	5-2000	0.991	2	5
5	Diazinon	10-2000	0.994	5	10
6	Cafeína		Patrón interno		
7	Clorpirifos-metil	10-2000	0.996	10	10
8	Terbutrina	10-2000	0.995	5	10
9	Pirimifos-metil	20-1000	0.997	10	20
10	Malatión	5-2000	0.999	2	5
11	Clorpirifos	5-2000	0.995	2	5
12	Metidatión	20-2000	0.996	10	20

Los coeficientes de correlación son ≥ 0.99 en todos los casos para ambos detectores, lo cual indica una buena linealidad de estos métodos en el intervalo estudiado. Los LD y LC han sido calculados como se ha descrito previamente para la determinación de plaguicidas en agua, pero fortificando en este caso blancos de aceite. Los LC están comprendidos entre 2-20 y 5-20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para los sistemas ECD y TSD, respectivamente.

✓ CG-MS/MS

Se observó una buena linealidad hasta los 1000 ó 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la mayoría de los casos (Tabla 23), excepto para el dimetoato (400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y trietazina (800 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabla 23. Parámetros analíticos para los plaguicidas con el sistema CG-MS/MS.

No.	Plaguicida	Intervalo lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	Diuron	5-1000	0.993	0.5	5
2	α -HCH	1-1000	0.999	0.5	1
3	Dimetoato	20-400	0.995	10	20
4	Simazina	3-2000	0.998	1	3
5	Atrazina	5-1000	0.998	2	5
6	Trietazina	10-800	0.997	5	10
7	β -HCH	0.5-1000	0.990	0.2	0.5
8	Terbutilazina	1-1000	0.995	0.5	1
9	δ -HCH	1-1000	0.994	0.5	1
10	Diazinon	5-1000	0.997	2	5
11	Lindano	0.5-1000	0.998	0.2	0.5
12	Formotion	20-1000	0.994	10	20
13	Clorpirifos-metil	5-2000	0.999	1	5
14	Heptacloro	3-1000	0.990	1	3
15	Carbaril	5-2000	0.990	1	5
16	Pirimifos-metil	1-2000	0.998	0.5	1
17	Terbutrina	20-1000	0.997	5	20
18	Fenitrotion	3-2000	0.997	1	3
19	Clorpirifos	0.5-1500	0.998	0.2	0.5
20	Aldrin	10-1000	0.999	5	10
21	Heptaclor-epox-a	5-2000	0.998	1	5
22	Heptaclor-epox-b	5-2000	0.997	1	5
23	Folpet	10-2000	0.990	5	10
24	α -Endosulfan	5-2000	0.997	1	5
25	Dieldrin	5-2000	0.999	1	5
26	Endrin	10-2000	0.998	5	10
27	β -Endosulfan	5-2000	0.994	1	5
28	DDD	0.5-2000	0.998	0.2	0.5
29	Endosulfan sulfato	5-1000	0.990	2	5
30	DDT	5-2000	0.998	1	5

Los coeficientes de correlación son ≥ 0.99 , lo cual indica una buena linealidad de los plaguicidas en el intervalo.

Con respecto a los LD obtenidos, si se comparan estos resultados con los obtenidos con los métodos propuestos recientemente por Ferrer y colab.¹⁰⁷ y Yagüe y colab.⁹³, se puede concluir que los métodos propuestos presentan límites de detección más bajos. Sólo Yagüe y colab. proporcionan resultados similares para plaguicidas organoclorados. Los LC oscilaron entre 0.5-10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ excepto para el dimetoato, formotion y terbutrina (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

2.4.4.3 REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y ESTUDIO DE RECUPERACIÓN

Se evaluó la repetibilidad de los métodos propuestos mediante la desviación estándar relativa (RSD) de 10 inyecciones consecutivas de un blanco de aceite fortificado con $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de plaguicidas. La precisión de los tres equipos cromatográficos para esta matriz es excelente, con valores de RSD $\leq 20\%$ para los tres sistemas de detección como se muestra en la Tabla 24.

Con respecto a la reproducibilidad, se evaluó mediante el análisis de tres blancos de aceite fortificados con $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de plaguicidas y los valores de RSD obtenidos son muy satisfactorios, encontrándose en todos los casos ≤ 24 para los tres sistemas de detección.

Se llevaron a cabo estudios de recuperación para cada uno de los tres métodos propuestos analizando aceite de oliva fortificado con una concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada plaguicida. Los resultados obtenidos también se muestran en la Tabla 24 y se puede observar como la exactitud de los métodos propuestos es bastante satisfactoria, oscilando entre 91-123, 82-100 y 89-105% para los sistemas ECD, TSD y MS/MS, respectivamente.

Tabla 24. Repetibilidad, reproducibilidad y exactitud de los métodos propuestos.

Plaguicida	Repetibilidad (%RSD)			Reproducibilidad (%RSD)			Recuperación (%)		
	ECD	TSD	MS/MS	ECD	TSD	MS/MS	ECD	TSD	MS/MS
Diuron	6		2	18		5	116		98
α -HCH	4		3	14		8	91		94
Dimetoato		11	7		15	11		97	102
Simazina		11	2		13	6		88	100
Atrazina		9	4		11	7		89	101
Trietazina			5			7			104
β -HCH	2		6	13		10	124	97	95
Terbutilazina		9	2		15	4			101
δ -HCH	3		6	16		8	105	82	95
Diazinon	1	20	7	13	24	12	100		99
Lindano			4			6			102
Formotion	8		5	17		8	120		105
Clorpirifos-metil	2	12	7	7	14	13	113	87	98
Heptacloro	3		4	15		9	112		95
Carbarilo			7			11			102
Pirimifos-metil		17	6		16	8		91	96
Terbutrina		19	3		23	5		100	89
Fenitroton	2		8	13		10	114		102
Clorpirifos		14	4		16	7		97	105
Metidación	1	13		8			98	92	
Malatión	2	11		16			112	87	
Aldrin	2		6	7		9	108		90
Heptaclor-epox-a	3		3	9		6	107		92
Heptaclor-epox-b	2		4	10		9	123		94
Folpet			7			15			96
α -Endosulfan	3		3	9		8	112		100
Dieldrin	2		4	8		9	117		98
Endrin	3		6	12		7	107		95
β -Endosulfan	2		3	6		5	114		95
DDD	2		5	10		9	112		102
Endosulfan sulfato	2		4	8		6	108		90
DDT	3		2	11		5	118		98

2.4.5 Ejercicio de intercomparación entre laboratorios

El método desarrollado usando GPC y CG-MS/MS para el análisis de plaguicidas en aceite se aplicó a una muestra de aceite de oliva de un ejercicio de intercomparación entre 9 laboratorios (Ref. JUNAN11/02, organizado por la Junta de Andalucía) fortificada con

diferentes plaguicidas organoclorados (0.110 mg kg^{-1}). Para cada laboratorio se obtuvo un valor de z-score (definido por la Organización Internacional para la Estandarización, Guía ISO 43-1:1997 E), el cual relaciona el error asociado con un resultado, con la desviación estándar derivada de la ronda de intercomparación.

$$z = \frac{x_i - \hat{x}}{\sigma}$$

donde:

x_i = valor obtenido.

\hat{x} = valor medio de los laboratorios, excluyendo aquellos claramente desviados con respecto al valor verdadero.

σ = desviación estándar de todas las determinaciones

Un z-score satisfactorio se consideraba en el intervalo $-2 < z\text{-score} < +2$.

Los resultados obtenidos con el método propuesto y el valor medio obtenido por el resto de laboratorios para cada uno de los plaguicidas se muestran en la siguiente Tabla 25. Como se puede observar, todos los valores obtenidos están dentro del intervalo "satisfactorio" especificado, indicando una buena exactitud.

Tabla 25. Resultados del CG-MS/MS para el ejercicio intercolaborativo. Valor aceptado de la concentración de cada plaguicida 0.110 mg kg^{-1} .

Plaguicida	Resultado (mg kg^{-1})	Valor medio (mg kg^{-1})	z-scorez
α -HCH	0.122	0.094	1.73
β -HCH	0.129	0.109	0.97
δ -HCH	0.136	0.099	1.17
Lindano	0.127	0.109	0.71
Heptaclor-epoxido	0.115	0.081	1.10
Aldrin	0.126	0.115	1.01
α -Endosulfan	0.116	0.101	1.36
β .Endosulfan	0.122	0.109	0.97
Endosulfan sulfato	0.110	0.111	-1.01
DDD	0.123	0.122	0.74
DDT	0.109	0.090	0.62
Endrin	0.120	0.092	0.92

2.5 Método de determinación de plaguicidas en aceituna

El objetivo de esta parte del trabajo es desarrollar y validar un método de extracción y análisis de plaguicidas en aceituna. El proceso consiste en una extracción sólido-líquido empleando éter de petróleo como extractante y usando un homogeneizador de alta velocidad. En este proceso, los residuos de plaguicidas se extraen junto con el aceite y se analizan en el extracto mediante CG-ECD, CG-TSD y CG-MS/MS de la misma forma que anteriormente se ha descrito para el aceite.

Finalmente, considerando que las aceitunas que se van a analizar se usan para obtener aceite de oliva, los resultados obtenidos con el método de extracción propuesto se compararon con los obtenidos cuando se extraía el aceite de las aceitunas (con los posibles residuos de plaguicidas incorporados) mediante un procedimiento físico, similar al usado en las almazaras para extraer el aceite de oliva (método Abencor). Esto permite además determinar la fracción de plaguicidas que son incorporados al aceite de oliva. Asimismo se analizó el orujo (residuo

sólido que queda después de la extracción del aceite) para estudiar la distribución de los plaguicidas durante el proceso de obtención del aceite.

2.5.1 Tratamiento previo de la muestra

Se deben examinar las muestras de aceituna para separar cualquier resto de piedras, hojas, ramas y tierra. Asimismo, también se deben eliminar las aceitunas que estén partidas o dañadas si se van a utilizar en procesos de optimización, pues este hecho podría distorsionar los resultados.

2.5.2 Procedimiento de extracción y clean-up

Para optimizar el proceso de extracción se fortifica una masa de aceitunas siguiendo el siguiente procedimiento: 2.5 kg de aceitunas exentas de residuos (recogidas en cultivos ecológicos) se esparcen en una bandeja formando una sola capa. Para obtener un nivel de fortificación de aproximadamente 2 mg kg^{-1} se añaden 50 mL de una disolución de plaguicidas (que contiene 5 mg de cada analito en acetona) usando un pulverizador comercial. Las aceitunas se reservaban durante 12 horas antes de los análisis.

La mayoría de los plaguicidas seleccionados son no-polares, por lo que se eligió éter de petróleo como disolvente para la extracción. También se ha investigado la adición de disolventes más polares como acetato de etilo y diclorometano al éter de petróleo en diferentes proporciones para favorecer la extracción de los plaguicidas más polares. La composición de las mezclas acetato de etilo/éter de petróleo y diclorometano/éter de petróleo probadas son: 0, 10, 30, 50 y 100% del disolvente adicional en ambas mezclas. Se llevó a cabo el estudio fortificando aceitunas (por triplicado) mediante pulverización sólo con

los plaguicidas más frecuentemente encontrados en muestras de aceite de oliva: simazina, terbutilazina, diuron y endosulfan (isómeros α y β).

Se observó cómo la adición de un 10% de acetato de etilo resultaba en una disminución de la cantidad de todos los plaguicidas extraídos, excepto simazina. A medida que el porcentaje de acetato de etilo aumentaba hasta 30%, las concentraciones encontradas disminuían significativamente y esta tendencia se mantenía con porcentajes mayores de este disolvente en la mezcla. Aparte de esto, porcentajes mayores de acetato de etilo también dificultaban el proceso de filtración obteniéndose extractos turbios. Ello era debido a la extracción de agua y hacía necesaria una segunda etapa de filtración sobre Na_2SO_4 anhidro. Por otra parte, surgieron problemas cuando se usaban altos porcentajes de acetato de etilo pues se formaban emulsiones en el proceso de extracción líquido-líquido (con acetonitrilo saturado con n-hexano) previo al proceso GPC.

En el caso de la adición de 10% de diclorometano, se obtuvieron recuperaciones algo mayores de los plaguicidas más polares (simazina y terbutilazina) que cuando se extraía con éter de petróleo solo. Sin embargo, se observó que las recuperaciones de endosulfan (isómeros α y β) disminuían. Un aumento en el porcentaje de diclorometano hasta un 30% no afectaba a las concentraciones obtenidas de diuron, simazina y terbutilazina mientras que las concentraciones de α y β -endosulfan disminuían. Asimismo se presentaron los mismos problemas que con el acetato de etilo en el proceso de filtración.

Se repitieron una serie de análisis de plaguicidas utilizando éter de petróleo solo y éter de petróleo con un 10% de diclorometano para comparar estadísticamente los resultados. La aplicación de un test por parejas concluyó que no existían diferencias significativas así que se escogió éter de petróleo, sin ningún tipo de mezcla, como disolvente extractante para análisis posteriores.

Para asegurar que la extracción era efectiva, se investigó la posible presencia de restos de plaguicidas en el residuo de pasta de aceituna que queda después de la extracción, sometiendo dicho residuo a un segundo proceso de extracción con éter de petróleo. Finalmente, este segundo residuo de aceitunas se extrajo con acetato de etilo en una tercera fase, aplicando un método de extracción de plaguicidas en vegetales con bajo contenido graso¹³² con pequeñas modificaciones: 100 g de residuo se extraen con 100 mL de acetato de etilo homogeneizando con Ultra-Turrax. El extracto se decanta y se transfiere a un matraz esférico de 250 mL filtrando sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo se extrae dos veces más con dos porciones de 50 mL de acetato de etilo, se combinan los extractos y se evapora una alícuota de 10 mL usando el rotavapor. El residuo se procesa como se ha descrito en el método para el análisis de plaguicidas en aceite de oliva. Para llevar a cabo este estudio se fortificó una muestra de aceitunas molidas con una disolución de plaguicidas (por triplicado) para obtener un nivel de concentración de 0.040 mg kg⁻¹.

Prácticamente no se detectaron residuos de plaguicidas en la segunda y la tercera extracción; sólo se detectaron concentraciones muy bajas en el caso de los plaguicidas más polares como el diuron. El porcentaje de residuos encontrado en estas dos extracciones era menor de 10% del total de los plaguicidas no-polares y aproximadamente un 20% de los más polares. Así pues, se consideró que un solo proceso de extracción con éter de petróleo era suficiente para la extracción de los plaguicidas de las aceitunas.

Finalmente, el proceso de extracción óptimo se resume a continuación: Se muelen aproximadamente 130 g de aceitunas (incluyendo los huesos) en un molino de martillo. Después se pesa una porción de 100 g en un vaso de vidrio y se añaden 50 g de Na₂SO₄ anhidro. La muestra se extrae con 100 mL de éter de petróleo homogeneizando con un Ultra-Turrax a una velocidad de 1300 r.p.m durante 1 minuto. El extracto se decanta y se transfiere a un matraz esférico de 250 mL filtrando sobre Na₂SO₄ anhidro. El proceso se repite dos veces

¹³² A. Agüera, L. Piedra, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, M. Contreras, Analyst 125 (2000) 1397.

más, homogeneizando el residuo con dos porciones de 50 mL de éter de petróleo. Se combinan los extractos y el disolvente orgánico (una cantidad total de 200 mL) se evapora usando un rotavapor equipado con un baño de agua a 50°C. Después de la evaporación queda un residuo oleoso en el matraz y éste se procesa aplicando el método para el análisis de plaguicidas en aceite de oliva.

2.5.3 Separación cromatográfica, identificación y cuantificación

Se analizó un blanco de aceituna y se compararon los cromatogramas obtenidos por los tres métodos propuestos con los patrones correspondientes para comprobar la posible coelución de especies de la matriz que son posibles interferentes.

✓ CG-ECD/TSD

La Figura.72 y Figura 73 muestra los cromatogramas correspondientes a una muestra de aceituna fortificada con $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ de plaguicidas analizada por ECD y TSD (los números corresponden a los plaguicidas de la Tabla 26 y Tabla 27, respectivamente). Como en los métodos descritos anteriormente, se obtiene una separación satisfactoria a excepción de los pares dimetoato y simazina en TSD y los dos isómeros del heptaclor-epóxido y endrín y β -endosulfan en ECD.

En el caso del ECD, la interferencia que eluye al tiempo de retención del lindano (pico nº 4) es mayor que en aceite, el pico es más ancho y esto provoca un solapamiento parcial con el δ -HCH (5). También se observa como disminuyen las respuestas relativas del diuron (1) y α -HCH (2). Esta disminución de la señal no impide su correcta cuantificación y validación.

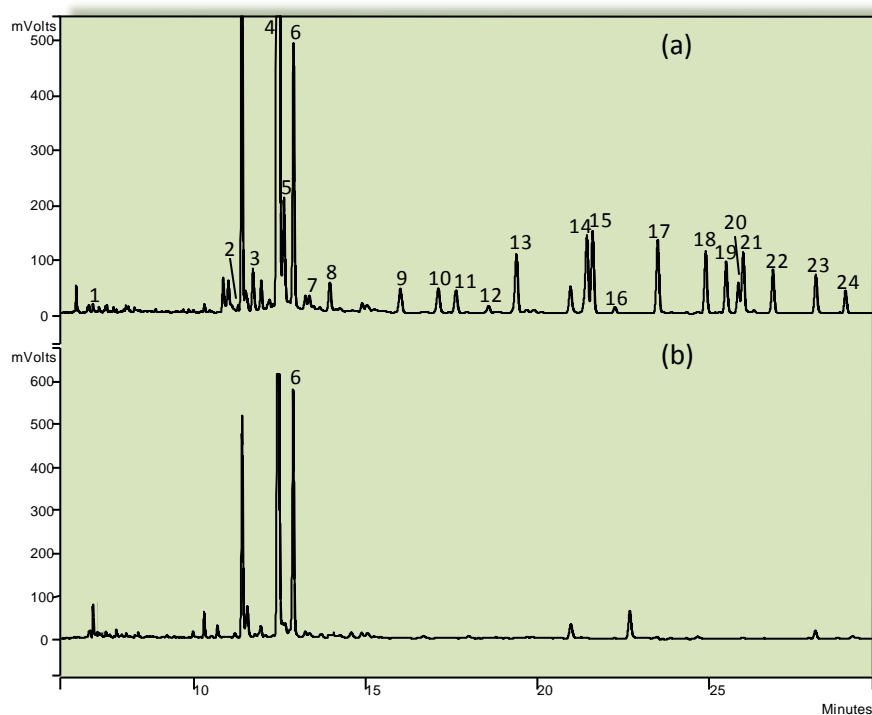


Figura.72. Cromatograma GC-ECD correspondiente a: (a) blanco de aceitunas fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceituna.

Asimismo, se observan positivos alrededor de los tiempos de retención del oxifluorfen (19) y endosulfan sulfato (23), aunque este hecho no imposibilita su cuantificación ya que se trata de picos muy pequeños.

En el caso del sistema TSD, al igual que ocurría en caso del aceite, no se observan interferencias de la matriz alrededor de los tiempos de retención de los plaguicidas estudiados debido a su alta selectividad.

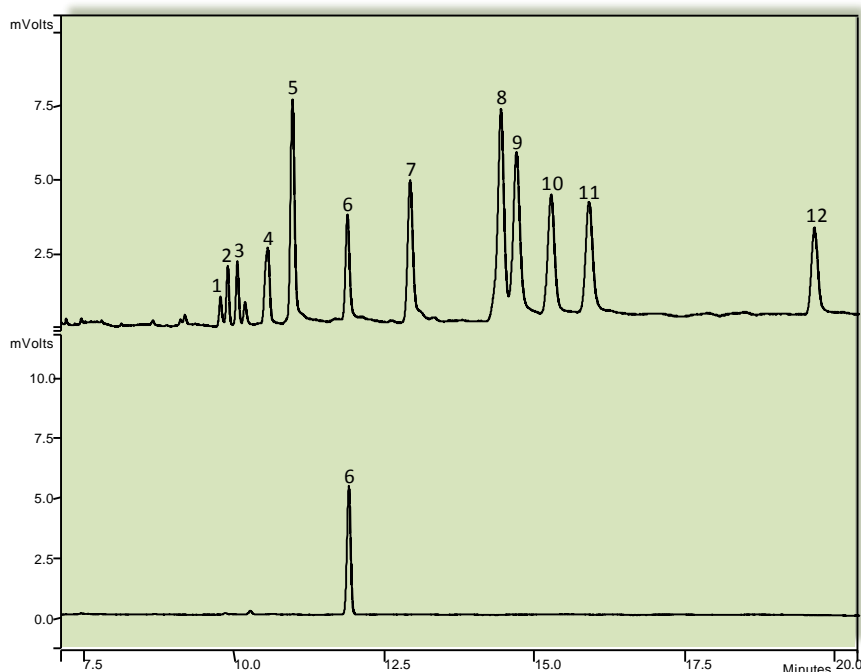


Figura 73. Cromatograma GC-TSD correspondiente a: (a) blanco de aceitunas fortificado, matriz $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceituna.

La identificación de los plaguicidas en las muestras de aceituna se hace en base a los tiempos de retención estándar. La cuantificación se lleva a cabo mediante el método del patrón interno (quintoceno y cafeína para los sistemas ECD y TSD, respectivamente).

✓ CG-MS/MS

La Figura 74 muestra un cromatograma correspondiente a una muestra de aceituna fortificada con $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ así como un blanco de aceituna analizados por CG-MS/MS. Los números corresponden a los plaguicidas de la Tabla 28. El criterio seguido para la confirmación de los positivos en las muestras de aceituna es el mismo que en los dos métodos anteriormente descritos basados en CG-MS/MS.

Como en el caso del método de determinación de plaguicidas en aceite, todos los plaguicidas se pueden cuantificar sin problemas a excepción de los plaguicidas organofosforados malatión y metidatión, que pueden ser determinados por CG-ECD/TSD. El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante el método del patrón externo.

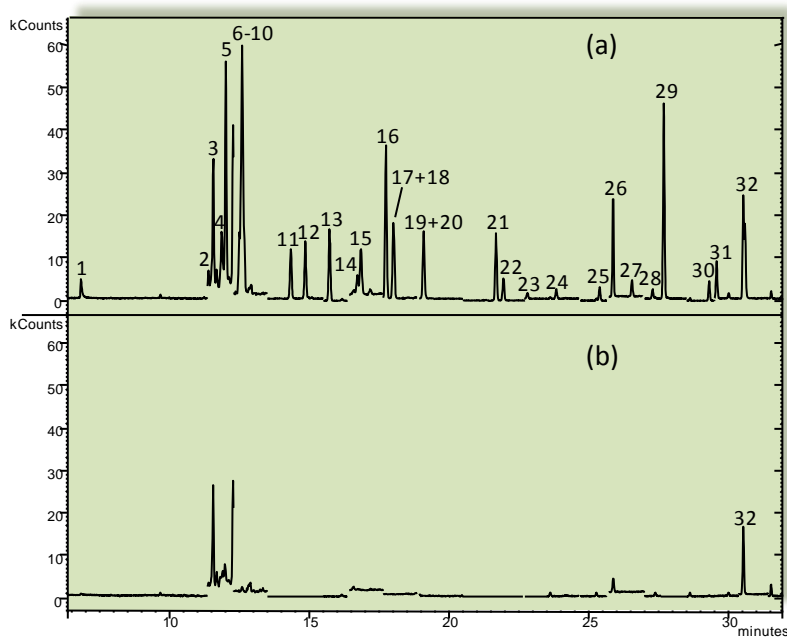


Figura 74. Cromatograma GC-MS/MS (Corriente iónica total, TIC) correspondiente a: (a) blanco de aceituna fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceituna.

También se observan algunos picos en el blanco de aceituna en los tiempos de retención de la simazina (4) y atrazina (5), pero si se monitorizan sus iones de cuantificación (Figura 75) se observa que ninguna de estas especies que coeluyen tiene algún fragmento en común con estos plaguicidas y, por tanto, no interfieren en absoluto en su cuantificación.

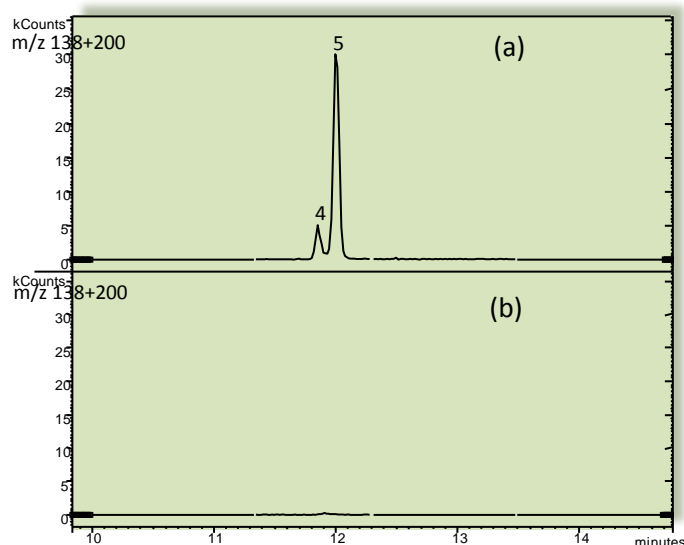


Figura 75. Monitorización MS/MS de los iones de cuantificación de la simazina y atrazina (138+200) en: (a) blanco de aceituna fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceituna.

Como ocurre en el método de análisis de plaguicidas en aceite mediante CG-MS/MS, en el cromatograma del blanco de aceituna se observa un pico cromatográfico que coincide con el tiempo de retención del dimetoato (3), pero si se comparan los espectros de masas correspondientes a esos picos se comprueba que no corresponden, por lo que esa interferencia no afecta su cuantificación.

Sin embargo, en el caso del oxifluorfen (26) se observa un pico en el cromatograma del blanco de aceituna en su mismo tiempo de retención. Cuando se monitoriza su ion de cuantificación (m/z 132), se comprueba que efectivamente, en el blanco se detecta algo de oxifluorfen (Figura 76). Se comprueba que los espectros de masas coinciden, pero la cantidad de oxifluorfen presente en los blancos de aceituna es muy pequeña, por lo que no impide su correcta validación y cuantificación.

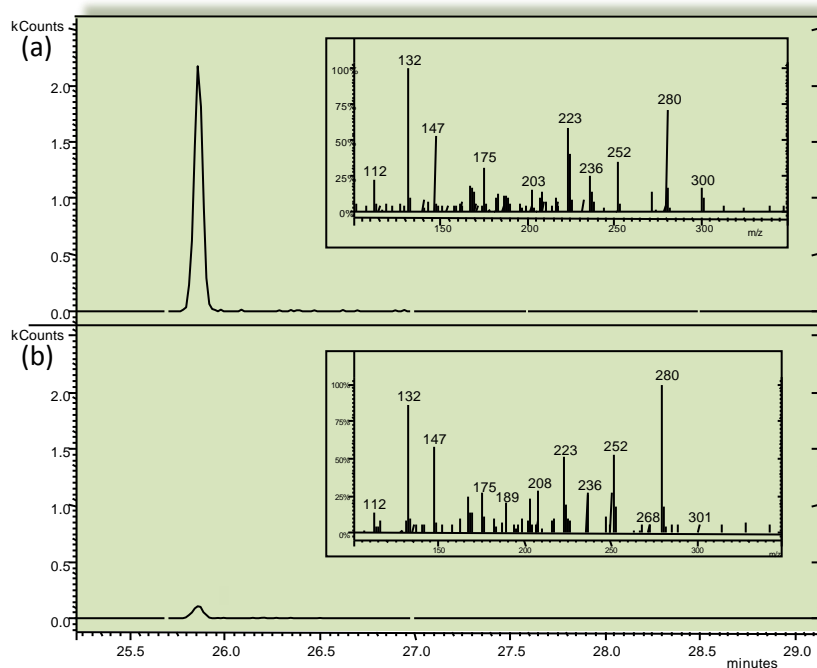


Figura 76. Espectros de masas correspondientes a la monitorización MS/MS del oxifluorfen (m/z 132) en: (a) blanco de aceituna fortificado, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) blanco de aceitunas. Interior: Espectros de masas correspondientes a cada pico.

2.5.4 Validación de los métodos cromatográficos

2.5.4.1 CALIBRACIÓN

Es necesaria una comparación entre la calibración hecha con patrones preparados en aceite de oliva y en aceituna puesto que las respuestas de los plaguicidas puede ser distinta en estas dos matrices.

Los estudios de recuperación que se describen en el apartado 0 se llevaron a cabo usando ambos tipos de calibración, observándose bajas recuperaciones usando las calibraciones en aceite para cuantificar. Por consiguiente, fue necesario usar una calibración basada en

patrones preparados con aceituna fortificada para los tres sistemas de detección. El proceso de fortificación se llevó a cabo como se describe a continuación: 100 g de blanco de aceituna molido (incluyendo el hueso) se ponen en un vaso de vidrio. Se añade el volumen apropiado de multipatrón de plaguicidas y 200 μL de patrón de recuperación (TPP) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, ambos en ciclohexano, homogeneizando manualmente. La muestra se mantiene a temperatura ambiente durante 3-4 horas antes de la extracción.

2.5.4.2 PARÁMETROS ANALÍTICOS

Se determinaron el intervalo lineal y linealidad así como los LD y LC en los tres sistemas cromatográficos para los plaguicidas estudiados.

✓ CG-ECD/TSD

Se observa una buena linealidad hasta los 250-500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para el sistema ECD y TSD como se muestra en la Tabla 26 y Tabla 27, excepto los casos del diuron y α -HCH debido a su peor respuesta en aceituna como se ha comentado anteriormente. También es excepción el caso del formotión debido a las interferencias de matriz que se observan alrededor de su tiempo de retención.

Tabla 26. Parámetros analíticos para los plaguicidas con el sistema CG-ECD.

Nº	Plaguicida	Intervalo lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	Diuron	5-500	0.945	2.5	5
2	α -HCH	1.25-250	0.962	0.5	1.25
3	β -HCH	1.25-375	0.999	0.25	1.25
4	Lindano				
5	δ -HCH	1.25-250	0.999	0.25	1.25
6	Quintoceno	Patrón interno			
7	Diazinon	5-500	0.990	1.25	5
8	Formotion	2.5-375	0.977	0.5	2.5
9	Clorpirifos-metil	1.25-375	0.999	0.5	1.25
10	Heptacloro	2.5-500	0.998	0.75	2.5
11	Fenitrothion	1.25-500	0.999	0.5	1.25
12	Malation	3.75-500	0.993	1.25	3.75
13	Aldrin	0.75-500	0.999	0.25	0.75
14	Heptaclor-epox-a	0.5-375	0.997	0.12	0.5
15	Heptaclor-epox-b	0.5-375	0.997	0.12	0.5
16	Metidation	5-375	0.996	2.5	5
17	α -Endosulfan	2.5-500	0.999	1.25	2.5
18	Dieldrin	0.5-500	0.999	0.12	0.5
19	Oxifluorfen	1.25-500	0.996	0.5	1.25
20	Endrin	0.5-375	0.997	0.12	0.5
21	β -Endosulfan	1.25-500	0.999	0.5	1.25
22	DDD	0.5-500	0.998	0.12	0.5
23	Endosulfan sulfato	1.25-500	0.996	0.5	1.25
24	DDT	5-375	0.9918	2.5	5

Tabla 27. Parámetros analíticos para los plaguicidas con el sistema CG-TSD.

No.	Plaguicida	Intervalo Lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	Dimetoato	2.5-375	0.998	1.25	2.5
2	Simazina	5-500	0.995	2.5	5
3	Atrazina	5-500	0.999	2.5	5
4	Terbutilazina	1.25-500	0.999	0.5	1.25
5	Diazinon	2.5-500	0.999	1.25	2.5
6	Cafeína	Patrón interno			
7	Clorpirifos-metil	2.5-500	0.996	2.5	2.5
8	Terbutrina	5-250	0.999	2.5	5
9	Pirimifos-metil	2.5-500	0.998	1.25	2.5
10	Malatión	1.25-500	0.998	0.5	1.25
11	Clorpirifos	1.25-500	0.999	0.5	1.25
12	Metidatión	5-500	0.994	2.5	5

El LD y LC se calculó siguiendo los mismos criterios descritos en los métodos anteriores fortificando aceitunas exentas de residuos.

Para el caso de CG-ECD/TSD, los LC varían entre 0.5-5 y 1.25-5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Todos estos valores son mucho menores que los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la Unión Europea para estos compuestos.

✓ CG-MS/MS

En el caso del CG-MS/MS se observó una buena linealidad hasta 250-2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabla 28), excepto para el dimetoato (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), simazina (125 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y trietazina (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

En todos los casos, los coeficientes de correlación eran >0.99 , excepto para el dimetoato y formotión, lo cual indica la buena linealidad de este método en el intervalo estudiado.

Los LC están comprendidos entre 0.12-5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ excepto para folpet y endrin (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Asimismo estos valores son mucho menores que los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la Unión Europea para estos compuestos (Tabla 4).

Tabla 28. Parámetros analíticos para los plaguicidas con el sistema CG-MS/MS.

No.	Plaguicida	Intervalo lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	Diuron	1.25-250	0.997	0.12	1.25
2	α -HCH	0.25-250	0.998	0.12	0.25
3	Dimetoato	5-100	0.945	2.50	5
4	Simazina	0.75-125	0.999	0.25	0.75
5	Atrazina	1.25-250	0.997	0.5	1.25
6	Trietazina	2.50-200	0.996	1.25	2.5
7	β -HCH	0.12-250	0.996	0.05	0.12
8	Terbutilazina	0.25-250	0.999	0.12	0.25
9	δ -HCH	0.25-250	0.996	0.12	0.25
10	Diazinon	1.25-250	0.998	0.5	1.25
11	Lindano	0.12-250	0.998	0.05	0.12
12	Formotion	5-250	0.950	2.5	5
13	Clorpirifos-metil	1.25-500	0.997	0.25	1.25
14	Heptacloro	0.75-250	0.994	0.25	0.75
15	Carbaril	1.25-500	0.999	0.25	1.25
16	Pirimifos-metil	0.25-500	0.994	0.12	0.25
17	Terbutrina	5-250	0.999	1.25	5
18	Fenitroton	0.75-500	0.992	0.25	0.75
19	Clorpirifos	0.12-375	0.997	0.05	0.12
20	Aldrin	2.5-250	0.998	1.25	2.5
21	Heptaclor-epox-a	1.25-500	0.997	0.25	1.25
22	Heptaclor-epox-b	1.25-500	0.996	0.25	1.25
23	Folpet	10-2000	0.991	5	10
24	α -Endosulfan	5-2000	0.999	1	5
25	Dieldrin	5-2000	0.997	1	5
26	Oxifluorfen	2.5-250	0.999	1.25	2.5
27	Endrin	10-2000	0.998	5	10
28	β -Endosulfan	5-2000	0.998	1	5
29	DDD	0.5-2000	0.997	0.2	0.5
30	Endosulfan sulfato	5-1000	0.998	2	5
31	DDT	5-2000	0.999	1	5

2.5.4.3 REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y ESTUDIO DE RECUPERACIÓN

La desviación estándar relativa (RSD) de análisis secuenciales en los cromatógrafos (n=10) se usó para establecer la repetibilidad de las medidas para cada sistema de detección. La reproducibilidad de los métodos se estableció mediante las RSD de los resultados para tres réplicas analizadas, no superando en ningún caso el 27%.

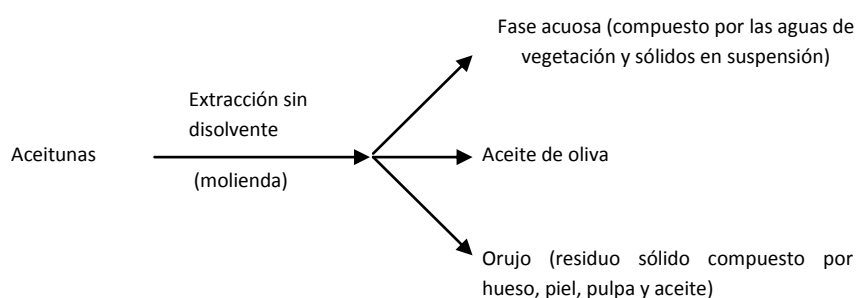
Tabla 29. Repetibilidad, reproducibilidad y exactitud de los métodos propuestos.

Plaguicida	Repetibilidad (%RSD)			Reproducibilidad (%RSD)			Recuperación (%)		
	ECD	TSD	MS/MS	ECD	TSD	MS/MS	ECD	TSD	MS/MS
Diuron	6		7	14		14	117		82
α -HCH	2		5	4		17	99		103
Dimetoato		7	13		11	22		114	71
Simazina		6	4		8	7		85	101
Atrazina		7	8		19	22		96	83
Trietazina			3			6			90
β -HCH	3		10	18		15	88		95
Terbutilazina		3	8		5	14		96	136
δ -HCH	4		5	6		14	88		107
Diazinon	10	12	3	23	23	5	121	97	103
Lindano			12			15			101
Formotion	8		9	21		14	77		86
Clorpirifos-metil	5	8	2	5	9	3	71	90	95
Heptacloro	8		12	18		16	81		134
Carbarilo			7			11			88
Pirimifos-metil		6	5		4	7		88	92
Terbutrina		9	3		17	5		94	103
Fenitroton	6		2	11		4	88		89
Clorpirifos		12	6		7	11		71	95
Metidatión	12	16	9	23	15	17	70	106	86
Malatión	4	8		6	14		76	96	
Aldrin	6			6			88		
Heptaclor-epox-a	5		10	7		14	89		96
Heptaclor-epox-b	5		6	2		14	91		114
Folpet			17			27			91
α -Endosulfan	5		8	3		13	94		133
Dieldrin	8		11	4		14	95		105
Oxifluorfen	9		4	2		6	93		75
Endrin	9		9	4		15	100		102
β -Endosulfan	7		6	3		11	92		99
DDD	8		10	8		12	94		105
Endosulfan sulfato	10		5	4		8	82		130
DDT	16		11	9		19	102		106

Los estudios de recuperación se llevaron a cabo por triplicado y los extractos se analizaron con los tres sistemas de detección fortificando aceitunas exentas de residuos con el volumen apropiado de multipatrón de plaguicidas en ciclohexano para conseguir una concentración final de $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. Los resultados obtenidos se encuentran entre 70-121, 71-114 y 82-136% para los sistemas ECD, TSD y MS/MS, respectivamente.

2.5.5 Extracción con Abencor

Se muelen aproximadamente 550g de aceitunas hasta formar una pasta usando un molino de martillo, se mezcla la pasta y se pesan 500 g en un cazo. Se añaden 100 g de talco natural como co-adyuvante tecnológico para aumentar el rendimiento graso durante el batido. Se coloca el cazo en la termobatidora (Figura 57) y se mantiene en agitación durante 20 minutos en un baño de agua a 25°C. Después se añaden 250 mL de agua caliente a la muestra y se agita durante 10 minutos. Se centrifuga la muestra durante 2 minutos, se recoge la fase líquida que contiene aceite de oliva junto con aguas de vegetación y se separan por decantación en una probeta de 500 mL. El orujo que queda se vuelve a enjuagar con 50 mL de agua caliente, se centrifuga 1 minuto y el mosto se recoge de nuevo. Así es posible obtener las tres fases que se resumen en el siguiente diagrama:



La Figura 77 muestra una comparación entre los resultados de plaguicidas obtenidos en aceituna considerando sólo el aceite de oliva extraído y la suma de las concentraciones encontradas en el aceite de oliva más el aceite de orujo para diuron y terbutilazina como ejemplo.

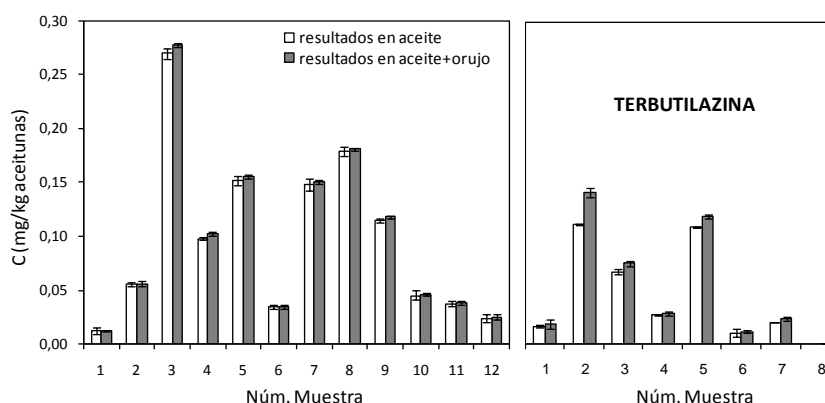


Figura 77. Concentración de plaguicidas (diuron y terbutilazina) encontradas en aceituna considerando solo el aceite de oliva extraído o el aceite de oliva+orujos.

Se ha llevado a cabo una comparación de los resultados mediante la *t* de Student¹³³ por parejas. Esta modalidad del test se aplica para comparar dos conjuntos de datos que no pertenecen a la misma muestra estadística y por lo tanto carecería de sentido calcular un valor promedio para cada uno de los conjuntos.

Si las concentraciones de plaguicidas en aceituna considerando el aceite de oliva solamente o el aceite de oliva+orujos no difieren significativamente, es decir, si las diferencias entre los resultados obtenidos son fruto únicamente de errores indeterminados, dichas diferencias estarán distribuidas aleatoriamente alrededor de cero. En tal caso, el promedio de las mismas no diferirá significativamente de cero y el planteamiento de hipótesis se haría de la siguiente forma:

- Hipótesis nula (H_0): $\bar{d} = 0$
 - Hipótesis alternativa (H_1): $\bar{d} \neq 0$
- donde, \bar{d} es la media aritmética de las diferencias

¹³³ R. Compañó Beltrán, A. Ríos Castro, Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos, Ed. Síntesis, Madrid, 2002, p. 114.

El valor experimental de t se calcula mediante la expresión:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\bar{d}|}{s_d/\sqrt{n}}$$

donde:

s_d = desviación estándar de las diferencias

n = número de muestras

El valor obtenido de t_{calc} se compara con un valor tabulado t_{crit} para un determinado nivel de significación y para $n-1$ grados de libertad.

Si $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$: los valores comparados no difieren significativamente.

Si $t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}}$: los valores comparados difieren significativamente.

En este caso concreto, para el diuron $t_{\text{calc}} = 1.998 < t_{\text{crit}} = 2.450$ ($P = 0.05$) y para la terbutilazina $t_{\text{calc}} = 1.998 < t_{\text{crit}} = 2.450$ ($P = 0.05$). Los resultados obtenidos no difieren significativamente por lo que se puede decir que la mayor parte de plaguicidas se transfieren al aceite de oliva, siendo el porcentaje de transferencia de más del 90% para la mayoría de ellos.

2.5.6 Comparación entre el método Abencor y el método propuesto

Para saber la proporción de plaguicidas que se transfieren de la aceituna al aceite durante su producción en las almazaras, se aplicó el método Abencor, por ser éste similar al utilizado en las almazaras. Los resultados obtenidos en muestras de aceite de oliva se refirieron a las aceituna considerando la masa de aceite obtenida a partir de una cierta masa de aceituna. Dichos resultados se compararon con los obtenidos aplicando el método de análisis propuesto anteriormente. En la Figura 78 se puede observar que no se observan tendencias claras entre

los resultados obtenidos para los tres plaguicidas detectados más frecuentemente: diuron, terbutilazina y endosulfan sulfato.

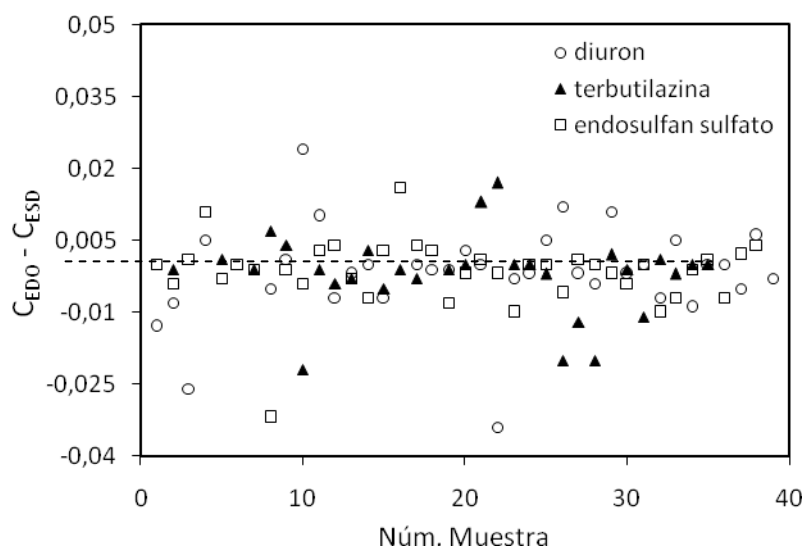


Figura 78. Diferencias de las concentraciones obtenidas en aceite (mg kg^{-1}) usando extracción con disolvente orgánico (EDO) y extracción sin disolvente (ESD).

Se llevó a cabo una comparación entre los resultados obtenidos con ambos métodos mediante el test de la t de Student por parejas. En el caso del diuron $t_{\text{calc}} = 0.552 < t_{\text{crit}} = 2.020$ ($P = 0.05$), para terbutilazina $t_{\text{calc}} = 1.169 < t_{\text{crit}} = 2.030$ ($P = 0.05$) y para endosulfan sulfato $t_{\text{calc}} = 1.351 < t_{\text{crit}} = 2.020$ ($P = 0.05$). Como ambos métodos no difieren significativamente, se puede concluir que es equivalente analizar la aceituna bien aplicando el método propuesto ó haciéndolo con el método Abencor. Sin embargo, el método propuesto es una alternativa más ventajosa ya que es más rápido y menos laborioso.

2.6 Control interno de la calidad en el análisis de plaguicidas

Para el seguimiento continuado del desarrollo de los análisis con objeto de decidir si los resultados son suficientemente fiables, se establecen tres operaciones para el control de calidad del análisis de plaguicidas mediante los tres sistemas cromatográficos y en las diferentes matrices de interés. Estas operaciones y los criterios utilizados son los establecidos por el Laboratorio CM-Europa, S.L. (laboratorio acreditado por ENAC para la determinación de plaguicidas en agua, aceite y verduras).

- **Ensayo en blanco**

Se emplea para detectar una posible contaminación aportada por el sistema. El ruido de fondo o las interferencias de los plaguicidas deben de estar por debajo de $1/3$ del LC. Si en el blanco aparece un pico al tiempo de retención de un plaguicida puede falsear el resultado del mismo. Habría que determinar el foco de contaminación y eliminarlo.

- **Control Continuo de la Calibración (CCC)**

El CCC verifica la calibración inicial al principio de cada tanda de análisis y después de cada 20 muestras. Se analiza un blanco fortificado de concentración más baja y un blanco fortificado del rango alto de la recta.

Los criterios de aceptación del CCC son los siguientes: calcular la concentración de cada plaguicida del blanco fortificado utilizado para el CCC y compararlo con el valor de concentración preparada. La cantidad calculada para cada plaguicida para niveles altos y medios de CCC debe estar entre el 70-120% del valor verdadero. La cantidad calculada para el nivel de calibración más bajo de cada plaguicida debe estar entre 50-120% del valor verdadero. Y si estas condiciones no se cumplen, entonces todos los datos de los problemas se consideran

no válidos y hay que actuar para solucionarlo, lo que puede necesitar una nueva calibración inicial.

- **Control del proceso**

El control del proceso se realiza con el patrón de recuperación, trifenílfosfato (TPP). Hay que añadir TPP a los blancos fortificados, a los blancos y a las muestras. El valor del TPP debe estar entre 70-130% del valor verdadero. Si no se cumple este criterio hay que revisar el proceso para detectar posibles errores en el mismo y si es necesario repetir la muestra.

Además de estas actividades de control interno de la calidad, siempre se han tenido en cuenta otros aspectos: utilización de unos equipos objeto de mantenimiento apropiado, verificados y calibrados; reactivos con las especificaciones adecuadas y patrones con trazabilidad perfectamente establecida. Todo ello garantiza la fiabilidad de los resultados obtenidos en el análisis de las distintas matrices, resultados que serán discutidos a continuación.

3. ESTUDIO A NIVEL DE LABORATORIO

Antes de pasar a estudiar el lavado de la aceituna a nivel de almazara, consideramos interesante llevar a cabo una serie de experiencias para estudiar el comportamiento de los plaguicidas más habituales cuando entran en contacto con la aceituna, con el fin de evaluar su posible eliminación mediante lavado.

Para llevar a cabo este estudio se han seleccionado aquellos plaguicidas más detectados en una primera prospección aleatoria de aceituna: tres herbicidas (diuron, terbutilazina y simazina) y el insecticida endosulfan (isómeros α y β).

La experiencia consiste en pulverizar aceitunas con estos plaguicidas y lavarlas cada cierto tiempo. Después se realizan análisis mediante CG-MS/MS de: (1) el agua obtenida después del lavado de la aceituna en el laboratorio y (2) la aceituna lavada, para poder conocer la fracción de plaguicidas sorbidas irreversiblemente sobre el fruto.

La aceituna se fortifica siguiendo el siguiente procedimiento: 1.5 kg de aceituna exenta de residuos se esparce en una bandeja en una sola capa. Se usaron las formulaciones comerciales de cada plaguicida para fortificar la aceituna. Para ello, se usaron en las dosis máximas recomendadas por los fabricantes: 3.5 L/ha Athado plus (Diuron y Terbutilazina) y Agrecina (Simazina); y 0.2 L/ha de Laipuran (Endosulfan) diluido al 0.3%.

La aceituna se pulveriza directamente con estos productos así que hay que hacer un cálculo aproximado previo teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- (1) 1 ha = 10000 m²
- (2) Área de un olivo ≈ 25 m²
- (3) Producción ≈ 100 kg aceitunas/olivo

Por lo tanto se concluye que: 1 ha ≈ 40000 kg aceitunas.

A continuación, se deja la aceituna en reposo durante 1 hora, se divide en diez porciones de 150 g cada una y se mantiene protegida de la luz. Simultáneamente también se separan 10 porciones de 150 g de blancos de aceituna.

Después de que la aceituna se fortifica con las formulaciones de plaguicidas y se divide en 10 porciones, la primera experiencia de lavado y el análisis de las muestras se llevan a cabo al día siguiente. Las experiencias posteriores se repiten una vez cada semana. Se diseñó el estudio para que tuviese la duración aproximada del plazo de seguridad de los herbicidas (9 semanas).

Para evaluar la reproducibilidad del procedimiento de fortificación así como la homogeneidad de diferentes partes de la misma muestra fortificada, se fortificaron cuatro porciones de 1.5 kg de aceituna. Cada porción se fortificó en una bandeja de plástico (50 x 30 cm y 10 cm de profundidad) en una sola capa pulverizando el producto comercial diluido con 25 mL de acetona. Finalmente se muestrearon cuatro porciones de cada masa de aceituna fortificada y se analizó.

Las conclusiones fueron:

- (1) La reproducibilidad de los análisis, expresada como desviación estándar relativa (RSD) es alrededor de un 10%, como media para todos los plaguicidas cuando se analizan diferentes porciones de la misma masa de aceituna fortificada.
- (2) La reproducibilidad en los análisis de aceituna de diferentes masas fortificadas está en el intervalo entre 20-30% dependiendo del plaguicida en cuestión.

3.1 Influencia de lavados sucesivos

En base a la cantidad aproximada de agua usada para el lavado continuo de la aceituna en las lavadoras en almazaras, se usó una proporción de 10 L de agua por 1 kg de aceituna. Así pues, cada porción de 150 g de aceituna fortificada se lava por inmersión en 1.5 L de agua del grifo durante un minuto con agitación. Cada muestra de aceituna fortificada tiene su correspondiente muestra control (blanco), la cual también se lava de la misma manera.

La Figura 79 muestra la concentración de los plaguicidas en las muestras de agua de cinco lavados sucesivos de aceituna fortificada con 2 mg kg^{-1} de cada uno de los plaguicidas. Un blanco de agua (agua del grifo) se analizaba con cada experimento de lavado para asegurar que no tenía residuos.

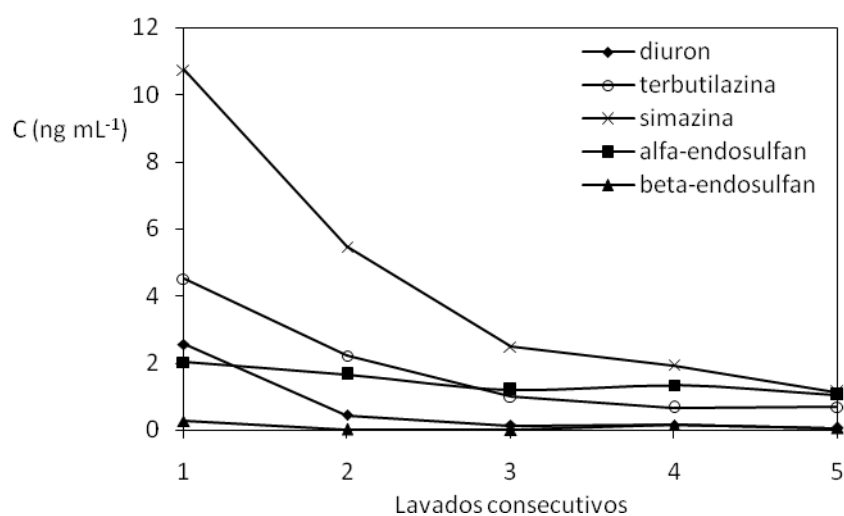


Figura 79. Concentración de plaguicidas en muestras de agua de cinco lavados sucesivos.

Se observan diferentes concentraciones de cada uno de los plaguicidas eliminados de la cutícula mediante el lavado. En general, el primer lavado es el más efectivo, eliminando la mayor cantidad de plaguicidas de las aceituna.

La simazina presenta mayores concentraciones en el agua de lavado y los niveles encontrados en lavados sucesivos disminuyen más rápidamente que en el resto de los plaguicidas. En este caso, el lavado parece ser muy eficiente en la eliminación de este residuo de la aceituna. Se observa una disminución similar para todos los plaguicidas desde el primer hasta el quinto lavado. Las cantidades cuantificadas en el quinto lavado son un 84% menor que en el primero. Sin embargo, se observa un descenso más acusado en el caso del diuron, en concreto un 93%, probablemente debido a su alta solubilidad en agua (42 mg L^{-1} , 20°C).

Para el α - y β -endosulfan, se encuentran concentraciones constantes en las muestras de agua procedentes de lavados sucesivos, lo cual evidencia la dificultad en la eliminación de este residuo, probablemente debido a su menor solubilidad en agua.

Al principio, cinco lavados consecutivos se consideraron suficientes para eliminar los plaguicidas de la aceituna, pero cuando se analizaron las muestras de agua se encontraron todavía cantidades significativas de residuos en el quinto lavado (entre 0-2 $\mu\text{g L}^{-1}$) como se puede ver en la Figura 79. Esta es la razón por la que se decidió establecer diez lavados sucesivos para asegurar la eliminación de la máxima fracción de plaguicidas posible en experiencias posteriores.

3.2 Persistencia de plaguicidas en la aceituna

La Tabla 30 muestra las concentraciones obtenidas en las aguas del lavado de aceitunas fortificadas durante el estudio. Cada uno de los resultados individuales para cada plaguicida es la suma de las concentraciones obtenidas en diez lavados sucesivos.

Tabla 30. Evolución de las concentraciones de plaguicidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) en las muestras de agua.

Plaguicida	Semanas después del tratamiento									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diuron	3.32	0.14	0	0.08	0.12	0.18	0.24	0.34	0.16	0.27
Terbutilazina	9.03	0.68	0.30	0.12	0.09	1.10	0.38	2.80	0.89	0.19
Simazina	21.72	11.17	1.86	0.95	0.48	0.80	0.63	1.23	0.31	0.76
α -Endosulfan	7.22	0.79	0.37	0.31	0.08	0.06	0.02	0.05	0.23	0.21
β -Endosulfan	0.46	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: No detectado.

Se observa una gran disminución de todos los niveles de plaguicidas encontrados en estas muestras desde el primer al segundo análisis (una semana después de la fortificación). Esta disminución es de un 85% excepto para el β -endosulfan (100%) y simazina (48%). Después de los análisis realizados la primera semana, las concentraciones encontradas en las siguientes experiencias permanecieron aproximadamente constantes excepto para la simazina, para la

cual los niveles siguieron disminuyendo progresivamente hasta el quinto análisis. Se comprueba cómo las concentraciones que se detectan de diuron y terbutilazina son bajas a pesar de ser los plaguicidas con mayor solubilidad en agua de los estudiados.

De forma similar se estudió la evolución de las concentraciones encontradas en la aceituna y los resultados se muestran en la Figura 80. Estos niveles corresponderían a los residuos de plaguicidas que penetran en las ceras cuticulares de la aceituna y que no se pueden eliminar con el lavado.

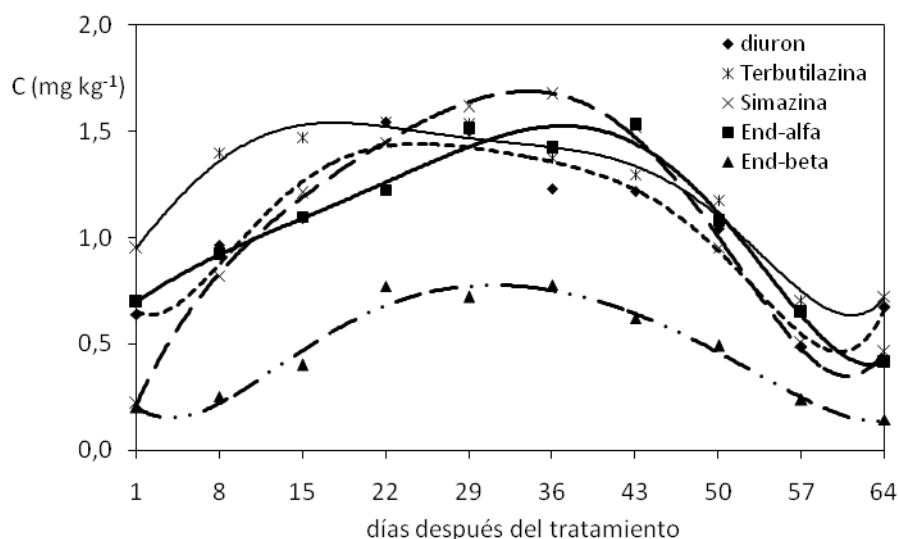


Figura 80. Evolución de la concentración de plaguicidas (mg kg^{-1}) en aceituna lavada.

Como era de esperar por la disminución progresiva observada en los niveles detectados en las muestras de agua de lavado, los niveles de plaguicidas en las aceitunas lavadas aumentan con el tiempo. En general, las concentraciones de plaguicidas en la aceituna lavada permanecen constantes en el periodo de tiempo comprendido entre la tercera y la quinta semana después del procedimiento de fortificación. Después, los niveles de residuos empiezan a disminuir a partir de la sexta-séptima semana posiblemente debido a la degradación de los ingredientes activos.

La Figura 81 muestra la distribución de plaguicidas entre el agua de lavado y la aceituna.

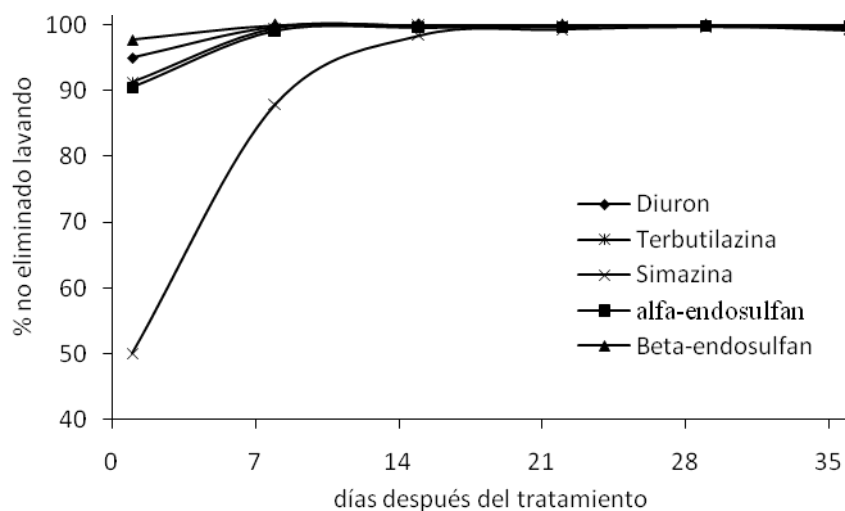


Figura 81. Distribución de plaguicidas entre el agua de lavado y aceituna.

La fracción de residuos que no ha sido eliminada mediante el lavado está representada frente al tiempo después del tratamiento. Sólo se ha considerado el periodo de tiempo antes de que comience la degradación de los plaguicidas. Como se puede comprobar, el primer proceso de lavado es el más efectivo en todos los casos. Una semana después de la fortificación de la aceituna, los plaguicidas pueden ser adsorbidos en las ceras epicuticulares e incluso podrían difundir a través de la membrana cuticular¹³⁴, evitando así su solubilización en agua en los procesos de lavado posteriores.

En el presente estudio, la simazina es el plaguicida para el cual el lavado es más efectivo, aproximadamente un 50% de este residuo se elimina en la primera experiencia de lavado. Incluso después de una semana, el lavado todavía elimina una cantidad significativa comparado con el resto de los plaguicidas. Este hecho no se puede explicar atendiendo a su solubilidad en agua (ver Tabla 2) ya que no es el más soluble de los plaguicidas estudiados.

¹³⁴ R.C. Kirkwood, *Pest. Sci.* 15 (1999) 69.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores, los cuales observaron que la solubilidad en agua de plaguicidas no juega un papel fundamental en su eliminación de diferentes productos mediante el lavado^{129,135}. Sin embargo, el valor de $K_{O/W}$ de la simazina es el más bajo (ver Tabla 2), lo cual está de acuerdo con la observación de que el coeficiente de partición entre la cutícula y el agua está bien relacionado con el coeficiente de partición octanol/agua, como estableció P. Baur¹³⁶.

En conclusión, la fracción de la mayoría de los plaguicidas que puede eliminarse mediante el lavado no es muy elevada. Además, el lavado sólo parece efectivo cuando la contaminación con el plaguicida es reciente.

4. ESTUDIO A NIVEL DE ALMAZARA

El objetivo de este estudio es, por una parte evaluar la influencia que el método de recogida de aceituna y la separación del fruto tiene sobre la presencia de estos residuos en la aceituna y, consecuentemente, en el aceite de oliva y por otra parte, evaluar la eficacia del proceso de lavado llevado a cabo en las almazaras sobre la eliminación de residuos de plaguicidas en aceituna. Para ello, se recogen y se analizan muestras de aceituna antes y después del proceso de lavado, agua de las lavadoras y muestras de aceite de oliva en tres almazaras diferentes.

¹³⁵ W.J. Krol, T.L. Arsenault, H.M. Pylypiw, M.J. Incorvia Mattina, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4666.

¹³⁶ P. Baur, H. Marzouk, J. Achönherr, T. Grayson, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3659.

4.1 Almazaras seleccionadas y toma de muestras

Para llevar a cabo el estudio de la situación real del lavado de la aceituna a escala de almazara, primero se procedió a seleccionar una serie de almazaras representativas, que presentan diferentes características en el proceso de lavado y que se denominan como sigue:

- ✓ **Almazara A.** Esta almazara procesa separadamente la aceituna de suelo y vuelo desde que se descargan en el patio. El proceso de lavado es diferente para la aceituna de suelo y de vuelo. Mientras que la aceituna de suelo se lava por inmersión en las lavadoras después de ser “duchada”, la aceituna de vuelo solamente se “ducha” por medio de aspersores en un sistema continuo.
- ✓ **Almazara B.** Esta almazara procesa también separadamente la aceituna de suelo y de vuelo y ambos tipos de aceituna se lavan por inmersión en lavadoras sin “ducha” previa.
- ✓ **Almazara C.** En esta almazara se procesa la aceituna conjuntamente sin separar la de suelo y la de vuelo. Por tanto, se lava toda junta por inmersión.

En cada almazara se seleccionan líneas de procesamiento de aceituna (una de aceituna de suelo y otra de vuelo en aquellas almazaras que separan el fruto). Se toman tres tipos de muestra en cada muestreo:

- ✓ Muestras de agua

Se toman muestras de agua a la entrada y a la salida de la lavadora. El agua de la entrada es el agua con la que se llena la lavadora y para muestrearla se consulta con el maestro de la almazara. Normalmente es agua corriente así que se toma directamente de un grifo. El agua de salida se toma directamente de la lavadora en el momento del muestreo.

El agua se recoge en botes de vidrio ámbar de 2.5 L de capacidad con tapón de rosca de teflón, se transporta al laboratorio y se mantiene en refrigeración a 4°C un corto periodo de tiempo hasta el análisis.

✓ Muestras de aceituna

Se toman muestras de aceituna antes del proceso de limpieza (justo al descargar el remolque) y a la salida de la lavadora, siempre con la ayuda de los operarios.

Se muestrea aproximadamente 1 kg de aceituna en bolsas de plástico, se transporta al laboratorio y se congela a -18°C hasta el análisis.

✓ Muestras de aceite

Las muestras de aceite se toman en cada una de las almazaras directamente de los tanques de almacenamiento, siempre consultando al maestro de almazara para tomar la muestra que se corresponda lo más posible a la aceituna anteriormente muestreada.

Las muestras se toman en botes de vidrio ámbar de 100 mL de capacidad con tapón de teflón, se transportan al laboratorio y se mantienen en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

Se ha muestreado en las almazaras durante tres campañas de recogida de aceituna consecutivas (campañas 2002-2003, 2003-2004 y 2004-2005). En cada una de ellas se planifican una serie de tomas de muestra que abarca toda la campaña, desde comienzos hasta finales (diciembre-marzo), estando cada toma separada por un periodo de dos semanas. Además, en la última campaña se llevó a cabo un estudio de los ciclos de lavado de las lavadoras. Para ello, se planificaron dos tomas de muestra: una a principios de campaña y otra a finales.

4.2 Influencia del método de recolección y el lavado en la presencia de residuos de plaguicidas en aceituna y aceite de oliva

Los métodos analíticos empleados para la determinación de plaguicidas en las matrices de interés son los desarrollados y optimizados anteriormente. La Tabla 31 resume los resultados obtenidos, recogiendo el número de muestras donde se detectaron residuos de plaguicidas.

Tabla 31. Resultados positivos en muestras de aceituna y aceite de oliva.

Plaguicida	Aceituna			Aceite de oliva		
	Suelo	Vuelo	No-separadas	Suelo	Vuelo	No-separadas
	n=50	n=20	n=24	n=15	n=10	n=8
Diuron	46	13	20	15	10	6
α -HCH	6	2	4	0	0	1
Simazina	2	1	1	5	2	2
Dimetoato	2	0	0	0	0	0
Atrazina	5	0	1	0	0	0
β -HCH	6	2	1	0	0	0
Terbutilazina	42	13	24	15	10	7
Lindano	2	1	2	0	0	0
Carbaril	2	1	3	0	0	0
Clorpirifos	2	0	0	5	2	2
α -Endosulfan	7	10	2	2	2	0
Dieldrin	2	0	0	0	0	0
β -Endosulfan	2	0	0	0	0	0
Endosulfan sulfato	26	9	16	9	9	5

n=número total de muestras analizadas.

Se detectaron catorce plaguicidas en las muestras analizadas, en las que se incluían aceituna antes y después del lavado en la almazara y aceite de oliva. Los herbicidas diuron y terbutilazina, así como, el endosulfan sulfato se han encontrado en la mayoría de las muestras de aceituna y aceite analizadas. Se han identificado también otros residuos (α -endosulfan, α -HCH y β -HCH), pero con menos frecuencia, y a concentraciones menores que el límite de cuantificación en la mayoría de los casos (estos residuos rara vez se detectan en el aceite de

oliva). Por tanto, sólo se van a considerar, para una comparación más detallada aquellos residuos de plaguicidas encontrados más frecuentemente con concentraciones mayores que el LC, que son: diuron, terbutilazina y endosulfan sulfato.

4.2.1 *Influencia del método de recolección*

Se ha evaluado la influencia que tiene la separación del fruto en función del método de recolección en la presencia de residuos de plaguicidas en la aceituna. Para ello, se analizó: (1) aceituna cosechada directamente del árbol sin que entren en contacto con el suelo (aceituna de vuelo); (2) aceituna recogida del suelo (aceituna de suelo); (3) así como aceituna de almazara donde no se lleva a cabo separación del fruto en función de su método de recogida (aceituna no-separada).

En la Tabla 32 se muestran los resultados obtenidos en muestras de aceituna recogidas antes de ser procesadas en la almazara en función de que sean de suelo, vuelo y no-separada. Las muestras de cada grupo y almazara se han clasificado en un orden decreciente de concentración de diurón.

Tabla 32. Resultados obtenidos en aceituna sin lavar.

	Almazara	Muestra	Concentración de plaguicidas (mg kg ⁻¹)		
			Diuron	Terbutilazina	Endosulfan sulfato
SSUELO	A	1	0.396*	0.303*	ND
		2	0.331*	0.296*	0.005
		3	0.191	0.239*	0.003
		4	0.141	0.162*	0.007
		5	0.139	0.257*	0.004
		6	0.039	0.051*	ND
		7	0.018	0.023	0.004
		8	0.009	ND	ND
		9	0.008	0.284*	ND
		10	0.007	0.013	ND
		11	0.003	0.023	ND
		12	ND	<LC	ND
	B	13	0.661*	0.560*	ND
		14	0.253*	0.321*	0.011
		15	0.129	0.152*	0.002
		16	0.073	0.101*	ND
		17	0.067	0.011	0.007
		18	0.062	0.018	0.002
		19	0.049	0.061*	0.012
		20	0.018	0.013	0.006
		21	0.011	ND	ND
		22	0.010	<LC	ND
		23	0.007	0.004	0.050
		24	ND	ND	0.016
		25	ND	<LC	0.002
VUELO	A	26	0.020	0.024	0.005
		27	0.016	0.046	ND
		28	0.009	0.015	0.003
		29	0.003	0.023	0.012
		30	0.003	<LC	0.008
	B	31	0.025	0.059*	0.010
		32	0.025	0.037	0.035
		33	<LC	ND	ND
		34	ND	ND	0.012
		35	ND	ND	0.005
NO-SEPARADA	C	36	0.120	0.116*	ND
		37	0.032	<LC	<LC
		38	0.033	0.013	0.007
		39	0.016	0.049	ND
		40	0.011	0.027	0.004
		41	0.011	0.018	ND
		42	0.009	<LC	0.006
		43	0.003	0.012	0.011
		44	<LC	<LC	<LC
		45	<LC	<LC	ND
		46	ND	0.007	ND
		47	ND	0.004	ND

ND: No detectado

LC: Límite de cuantificación

*Valores que superan el LMR

Con respecto a la aceituna de suelo, se cuantificó diuron en veintidós de las veinticinco muestras analizadas. En cuatro muestras la cantidad encontrada era mayor que el LMR fijado por la UE (0.2 mg kg^{-1}). Se cuantificaron residuos de terbutilazina en diecinueve muestras y se detectaron a niveles menores que el LC en tres muestras. Los resultados obtenidos estaban por encima del LMR (0.05 mg kg^{-1}) en doce muestras.

En la aceituna de vuelo, se comprueba como los niveles que se obtienen son significativamente menores que los obtenidos en la aceituna de suelo. En el caso del diuron, los valores detectados no estaban en ningún caso por encima del LMR (la cantidad más alta encontrada era unas diez veces menor que el LMR). Para la terbutilazina, sólo la concentración encontrada en una muestra (0.059 mg kg^{-1}) está ligeramente por encima del límite. En el caso del endosulfan sulfato, se cuantificó en catorce de veinticinco muestras de aceituna de suelo y en ocho de diez muestras de aceituna de vuelo, estando todas las concentraciones en el mismo intervalo y por debajo del LMR.

Estos resultados sugieren que los residuos de herbicidas se deben principalmente a la contaminación de la aceituna cuando entra en contacto con el suelo después de caer. Los niveles encontrados en este tipo de aceituna son significativamente mayores que aquellos correspondientes a aceituna que no ha estado en contacto con el suelo (aceituna de vuelo). En cambio, los niveles de endosulfan sulfato no son muy diferentes en la aceituna de vuelo y suelo. Debido a que el endosulfan se libera directamente a la atmósfera durante la aplicación, el aire lo puede transportar largas distancias y la vía más plausible de contaminación es cuando la aceituna todavía está en el árbol. Esto explica los casos en los que se detecta en aceituna a pesar de que no se haya aplicado directamente.

La Tabla 32 también muestra los resultados de muestras de aceituna de una almazara que no separa la aceituna en función de que sea de vuelo o de suelo. Aunque los resultados no son concluyentes, en general aparecen niveles de plaguicidas que parecen estar comprendidos entre los que se detectan en la aceituna de suelo y de vuelo. Sólo una muestra excedió el LMR

en el caso de la terbutilazina. También hay que considerar que debido a que esta almazara no considera el origen de la aceituna, puede ocurrir que la mayoría de las muestras de aceituna se hubieran recogido del árbol.

4.2.2 Eficiencia del proceso de lavado

Una vez que la aceituna llega a la almazara, se somete a diferentes procesos (los cuales se han descrito en la introducción) empezando por una etapa de limpieza que incluye un lavado.

La Tabla 33 muestra los resultados obtenidos en el análisis de aceituna de suelo, vuelo y no-separada después del lavado en la almazara. Los números de muestra corresponden a los mismos que se han empleado en la Tabla 32.

Las conclusiones más interesantes son la reducción de residuos de herbicidas en la aceituna de suelo cuando se comparan con la misma aceituna sin lavar (Tabla 32). Sólo dos muestras excedieron el LMR para la terbutilazina y ninguna de ellas para el diuron.

En esta Tabla también se comprueba que los niveles encontrados para la aceituna de vuelo en la almazara A son menores que en la almazara B. Teniendo en cuenta que la diferencia entre ellas es que la almazara A ducha la aceituna de vuelo mientras que la B las lava por inmersión, se podría concluir que la ducha parece ser más efectiva en la eliminación de residuos de plaguicidas, aunque el número de muestras analizadas es pequeño y ello no se puede afirmar de forma concluyente.

Tabla 33. Resultados obtenidos en la aceituna lavada.

	Almazara	Muestra	Concentración de plaguicidas (mg kg ⁻¹)		
			Diuron	Terbutilazina	Endosulfan sulfato
SUELO	A	1	0.020	0.037	ND
		2	0.008	0.027	0.003
		3	0.009	0.026	0.003
		4	0.052	0.044	0.009
		5	0.008	0.016	0.003
		6	<LC	ND	ND
		7	0.031	0.066*	ND
		8	0.043	ND	ND
		9	0.016	0.135*	ND
		10	<LC	<LC	ND
		11	ND	<LC	ND
		12	<LC	0.013	<LC
	B	13	0.007	0.006	ND
		14	0.007	0.004	0.012
		15	ND	<LC	ND
		16	<LC	0.006	ND
		17	0.029	0.011	0.009
		18	0.057	ND	ND
		19	0.051	0.046	0.018
		20	<LC	0.009	ND
		21	0.020	<LC	ND
		22	0.013	ND	<LC
		23	0.004	ND	0.012
		24	0.004	0.009	0.006
		25	ND	<LC	ND
VUELO	A	26	0.001	<LC	ND
		27	ND	<LC	ND
		28	0.004	0.003	0.004
		29	<LC	0.004	0.011
		30	0.004	0.005	0.008
	B	31	ND	ND	0.021
		32	0.021	0.088*	0.008
		33	<LC	<LC	0.040
		34	0.011	0.035	0.040
		35	ND	<LC	<LC
NO-SEPARADA	C	36	0.071	0.059*	ND
		37	0.005	0.008	0.007
		38	0.009	0.003	0.004
		39	0.025	0.072*	0.004
		40	0.063	0.084*	ND
		41	0.068	0.044	0.004
		42	<LC	ND	ND
		43	<LC	<LC	<LC
		44	0.003	ND	ND
		45	<LC	0.022	ND
		46	<LC	0.012	ND
		47	ND	<LC	ND

ND: No detectado

LC: Límite de cuantificación

*Valores que superan el LMR

Las concentraciones de plaguicidas encontradas en la aceituna lavada se compararon con las encontradas en la aceituna sin lavar mediante el test de Wilcoxon de rangos signados. Para calcular el rango de Wilcoxon, se calculan las diferencias entre concentraciones de residuo en aceituna lavada y sin lavar, se ordenan de menor a mayor los valores absolutos de dichas diferencias que sean diferentes de cero. A cada uno de los ordinales generados (rango) se le asigna el signo correspondiente de la diferencia original. A continuación se suman los ordinales positivos y negativos por separado y el menor de los valores absolutos resultantes se compara con una tabla de valores y se calcula la probabilidad para dos colas. Los cálculos se realizaron empleando el programa WinStat para Microsoft Excel. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 34. El análisis estadístico usando este test de rangos signados dio valores de P menores que el valor de la hipótesis nula de 0.05, indicando que hay diferencias significativas entre las muestras lavadas y sin lavar para el caso de los herbicidas diuron y terbutilazina en la aceituna de suelo. Únicamente en estos casos puede afirmarse que el lavado reduce significativamente las concentraciones de residuos en la aceituna.

Tabla 34. Resultados del test de Wilcoxon de rangos signados para determinar la influencia del lavado en la reducción de residuos de plaguicidas en aceituna.

	Plaguicida	Valor de P	Influencia (P<0.05)
Suelo	Diuron	0.0056	Sí
	Terbutilazina	0.0009	Sí
	Endosulfan sulfato	0.0640	No
Vuelo	Diuron	0.0929	No
	Terbutilazina	0.4838	No
	Endosulfan sulfato	0.6744	No
No-separada	Diuron	1.0000	No
	Terbutilazina	0.4148	No
	Endosulfan sulfato	0.7353	No

El efecto del lavado de aceituna en la presencia de residuos en el fruto se puede visualizar mejor en la Figura 82.

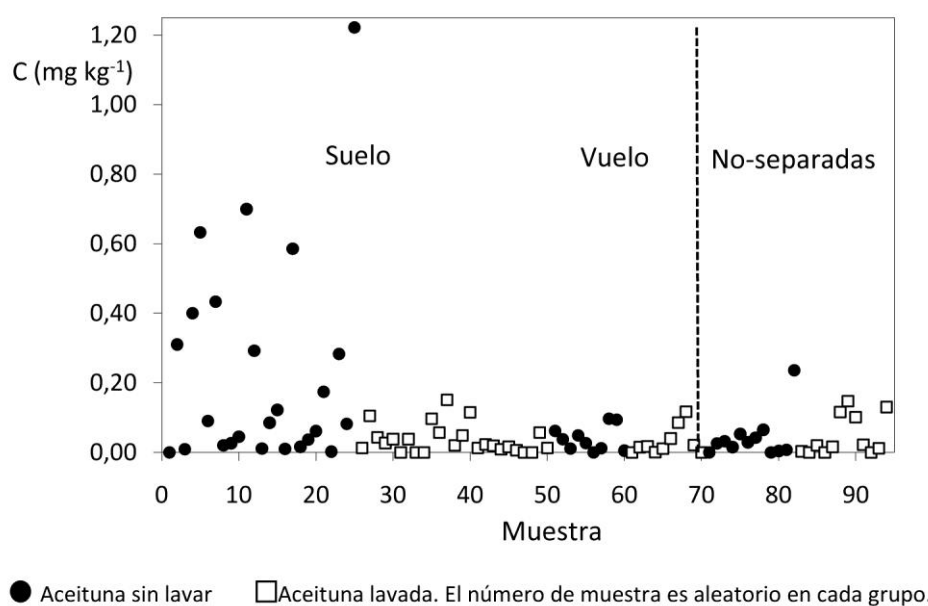


Figura 82. Distribución del contenido total de plaguicidas en aceituna de suelo, vuelo y no-separada.

Se observa como el lavado disminuye significativamente los niveles de residuos de plaguicidas en la aceituna de suelo mientras que la influencia del lavado no se ve tan claramente en la aceituna de vuelo. En el caso de aceituna no-separada, alguna aceituna lavada presenta mayores niveles de residuos que la que no está lavada. Esto se puede deber a la contaminación de aceituna libre de residuos durante el proceso de lavado si se ha lavado previamente aceituna de suelo altamente contaminada. Las lavadoras de aceituna se limpian y el agua (alrededor de 20 m³) se cambia al principio de la jornada de trabajo. Posteriormente, se vuelve a cambiar con una regularidad que depende del volumen de aceituna que entre en la almazara. Con esta sistemática, se pueden lavar unos 160000 kg de aceituna antes de que el agua se cambie, alcanzando así altos niveles de contaminación en ciertas ocasiones.

El proceso de lavado no parece influenciar los niveles de concentración de endosulfan sulfato encontrados en todos los tipos de aceituna (ver Tabla 32 y Tabla 33). Este hecho se debe probablemente a la adsorción de este compuesto sobre la cera de la superficie del fruto debido a su marcado carácter lipofílico, como ha sugerido Cabras y colab. para otros

insecticidas¹²⁹. La misma razón podría explicar la dificultad en la eliminación de algunos residuos de herbicidas mediante el lavado. Solamente la contaminación superficial con herbicidas, que se produce principalmente en aceituna de suelo, se podía eliminar mediante el proceso de lavado.

Las muestras de agua de lavado de las lavadoras de las tres almazaras en también se analizaron y los resultados confirman las conclusiones mencionadas anteriormente (Tabla 35). Los números de muestra coinciden con los empleados para la Tabla 32 y Tabla 33. Además, se analizaron muestras de agua a la entrada de las lavadoras para asegurar que estaba libre de residuos. Se detectaron diuron y terbutilazina en todas las muestras de agua tomadas en las lavadoras de aceituna de suelo. Los niveles de concentraciones estaban comprendidos entre 0.3 y 39.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para diuron y 0.04 y 28.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para terbutilazina. En el caso de muestras de agua de lavadoras de aceituna de vuelo, sólo se dispone de los resultados para la almazara B ya que las aceitunas de vuelo en la almazara A no se lavaban en una lavadora por inmersión sino que sólo se “duchaban”, tal y como se comentó anteriormente. Los niveles de concentración encontrados en las muestras de agua del lavado de aceituna de vuelo son significativamente menores (0.22-1.36 y 0.03-1.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para diuron y terbutilazina, respectivamente).

Tabla 35. Resultados obtenidos en las aguas de lavado de aceituna.

	Almazara	Muestra	Concentración de plaguicidas ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
			Diuron	Terbuthylazine	Endosulfan sulfate
SUELO	A	1	10.32	16.13	ND
		2	2.93	1.12	ND
		3	12.79	21.41	ND
		4	6.24	11.95	ND
		5	7.13	5.01	ND
		6	3.66	3.76	ND
		7	13.25	19.09	ND
		8	7.07	11.04	ND
		9	8.40	9.35	ND
		10	23.70	18.83	ND
		11	19.83	15.36	ND
		12	5.96	2.23	ND
	B	13	5.07	1.71	ND
		14	0.30	0.02	ND
		15	3.84	0.04	ND
		16	13.05	0.28	ND
		17	13.40	11.33	ND
		18	9.42	2.21	ND
		19	5.35	1.15	ND
		20	39.40	28.49	ND
		21	1.90	0.32	ND
		22	1.24	1.13	ND
		23	4.07	0.81	ND
		24	34.17	19.02	ND
		25	8.60	0.11	ND
VUELO	A	26	-	-	-
		27	-	-	-
		28	-	-	-
		29	-	-	-
		30	-	-	-
	B	31	0.22	0.22	ND
		32	0.23	0.03	ND
		33	0.38	0.06	ND
		34	1.36	1.72	ND
		35	0.27	0.91	ND
NO-SEPARADA	C	36	3.18	2.09	ND
		37	2.04	0.80	ND
		38	16.16	2.66	ND
		39	1.98	1.91	ND
		40	4.46	3.25	ND
		41	2.81	2.37	ND
		42	7.09	27.54	ND
		43	5.40	3.39	ND
		44	2.92	10.75	ND
		45	1.53	2.81	ND
		46	2.16	1.76	ND
		47	2.26	3.31	ND

ND: No detectado

LC: Límite de cuantificación

En el agua de lavado de aceituna sin separar se detectan niveles similares al agua procedente del lavado de aceituna de suelo ($1.53-16.16 \mu\text{g mL}^{-1}$ para diuron y $0.80-27.54 \mu\text{g mL}^{-1}$ para terbutilazina, respectivamente). Este hecho también está de acuerdo con la hipótesis de que la aceituna sin residuos puede ser contaminada durante el proceso de lavado en las almazaras donde los distintos tipos de aceituna no se separan. El endosulfan sulfato no se detectó en ninguna de las muestras de agua de lavado.

4.2.3 Residuos en aceite de oliva

Por último, se pretende comprobar la posible influencia del método usado para recoger la aceituna y su separación en la almazara, en la presencia de residuos de plaguicidas en el aceite obtenido. Se recogieron una serie de muestras de aceite de oliva en las tres almazaras en estudio. Para las comparaciones que se pretendían llevar a cabo habría sido deseable analizar el aceite obtenido en las almazaras con las mismas muestras de aceituna que se analizaron. Sin embargo, esto es difícil de conseguir en la planta industrial porque miles de kilogramos de aceituna se procesan continuamente y no se puede saber exactamente el aceite que corresponde a cada partida de aceituna. Así pues, las muestras de aceite se recogieron en el tanque de almacenamiento correspondiente según indicaciones del maestro de almazara. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 36. Las muestras de cada grupo y almazara han sido ordenadas en orden decreciente de concentración de diurón para conseguir una mejor visualización.

Tabla 36. Resultados obtenidos en las muestras de aceite de oliva.

	Almazara	Muestra	Concentración de plaguicidas (mg kg ⁻¹)		
			Diuron	Terbutilazina	Endosulfan sulfato
SUELO	A	1	0.170	0.150	<LC
		2	0.140	0.140	<LC
		3	0.130	0.130	<LC
		4	0.119	0.175	ND
		5	0.053	0.103	0.019
		6	0.046	0.146	ND
		7	0.035	0.196	ND
		8	0.014	0.014	ND
	B	9	0.220	0.150	0.040
		10	0.180	0.140	0.030
		11	0.130	0.080	0.054
		12	0.108	0.113	ND
		13	0.104	0.138	ND
		14	0.060	0.079	0.048
		15	0.033	0.049	0.031
VUELO	A	16	0.050	0.070	<LC
		17	0.037	0.098	0.041
		18	0.015	0.031	0.023
		19	0.013	0.072	ND
		20	0.013	0.045	0.019
	B	21	0.080	0.090	0.090
		22	0.039	0.021	0.074
		23	0.029	0.062	0.017
		24	0.021	0.081	0.066
		25	0.013	0.011	0.014
NO-SEPARADA	C	26	0.100	0.120	ND
		27	0.100	0.100	<LC
		28	0.080	0.120	<LC
		29	0.051	0.104	0.023
		30	0.037	0.118	0.016
		31	0.025	0.077	0.011
		32	0.018	0.068	ND
		33	ND	0.050	0.010

ND: No detectado

LC: Límite de cuantificación

Los tres plaguicidas encontrados más frecuentemente en la aceituna se encuentran también en el aceite de oliva. Una comparación rápida entre los niveles de residuos encontrados en la aceituna lavada y en el aceite de oliva revela un efecto de concentración en el aceite. Este hecho tiene sentido considerando que se necesitan como media cinco kilogramos de aceituna

para obtener un litro de aceite de oliva y, por consiguiente, es de esperar que se produzca una concentración en el aceite de oliva, especialmente en el caso de los plaguicidas lipofílicos. Además, como es de esperar por los resultados obtenidos en aceituna, los valores medios encontrados de los dos herbicidas en el aceite de oliva procedente de aceituna de vuelo son algo menores que los que se obtienen en el aceite procedente de aceituna no-separada y aceituna de suelo. Concretamente, el aceite de oliva procedente de aceituna sin separar muestra unas concentraciones de herbicidas intermedias entre las del aceite procedente de aceituna de vuelo y de suelo, mientras que los residuos de endosulfan sulfato no siguen este patrón.

También hay que mencionar que ninguna de las muestras de aceite analizadas a partir de aceituna de suelo (siempre y cuando no se mezcla en la almazara con aceituna de vuelo) se podría vender como “aceite de oliva virgen extra” (el aceite de oliva de mayor calidad). La razón es que no cumplen con los parámetros de calidad como la acidez, establecida por la Unión Europea para esta categoría^{137,138} (acidez, índice de peróxidos, K_{270} , etc.). Durante la etapa de refinado a que se someten estos aceites la concentración de residuos se verá posiblemente disminuida¹³⁹, por lo que este tipo de aceites nunca llegaría al mercado y al consumo directo.

¹³⁷ Comisión reguladora (EEC), Núm. 2568/91 sobre las características del aceite de oliva y de orujo y sobre los métodos relevantes de análisis.

¹³⁸ Comisión reguladora (EEC), Núm. 1989/2003 modificando la regulación (EEC) Núm. 2568/91 sobre las características del aceite de oliva y aceite de orujo de oliva y sobre los métodos relevantes de análisis.

¹³⁹ M.V. Ruíz Méndez, I. Pérez de La Rosa, A. Jiménez Márquez, M. Uceda Ojeda. *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 23.

5. EFICACIA DEL PROCESO DEL LAVADO DE ACEITUNA EN ALMAZARAS Y PROPUESTA DE UN MÉTODO DE DESCONTAMINACIÓN

5.1 Estudio de los ciclos de lavado en almazaras

En virtud de los resultados descritos en el punto anterior, se ha comprobado cómo un alto nivel de contaminación en las aguas de las lavadoras puede conducir a que se produzca la contaminación de aceituna que en principio entra a las lavadoras libre de residuos. Por esta razón, se consideró de interés el estudio de los ciclos de lavado en las almazaras, es decir, la evolución de la contaminación del agua usada para lavar la aceituna desde el principio hasta que ésta se cambia así como comprobar si dicha evolución también afecta a la eliminación de residuos de plaguicidas en la aceituna.

Para llevar a cabo este estudio, se recogieron muestras tanto de agua de las lavadoras como de aceituna a lo largo de un ciclo de lavado en las almazaras que separaban las aceitunas de vuelo y de suelo. En cada una de las almazaras se escogió una línea de procesado de aceitunas de suelo para llevar a cabo la toma de muestras pues se intentó trabajar con la situación menos favorable, en términos de detectar una mayor concentración de plaguicidas. En el apartado anterior se ha comprobado cómo la aceituna recogida del suelo presenta mayores niveles de plaguicidas que la que se recoge directamente del árbol.

- *Muestras de agua*

Se recogieron cinco muestras de agua de las lavadoras de las almazaras durante un ciclo de lavado, el cual dura desde que empieza el lavado con agua limpia hasta que el agua se cambia. El tiempo que dura un ciclo depende de la cantidad de aceituna lavada y se establece por el maestro de almazara. La toma de muestra en la mitad del ciclo no supone la interrupción de la cadena de producción.

- *Muestras de aceituna*

Se recogieron tres muestras de aceituna: principio, mitad y final del ciclo de lavado.

La Figura 83 muestra la evolución de la concentración de plaguicidas en agua así como la cantidad de sólidos en suspensión durante el ciclo de lavado en el muestreo nº1.

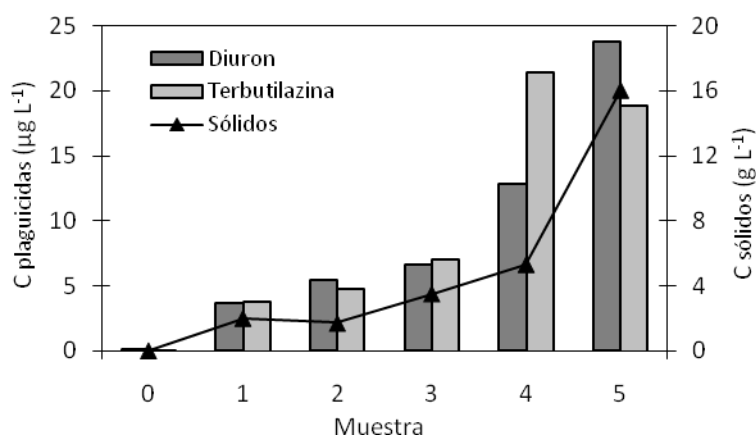


Figura 83. Concentración de plaguicidas y nivel de sólidos a lo largo de un ciclo de lavado.

Sólo se han representado los herbicidas terbutilazina y diuron porque eran los que se encontraron en cantidades significativas en todas las muestras de agua de lavado analizadas. También se detectó frecuentemente simazina, pero a muy bajas concentraciones (siempre menores que $1 \mu\text{g L}^{-1}$). Se puede observar como la concentración de ambos herbicidas así como el nivel de sólidos en suspensión aumentan conforme aumenta la cantidad de aceituna lavada.

Los resultados obtenidos en las aguas de lavadora así como las encontradas en aceituna (antes y después del lavado) se resumen en la tabla 37, donde sólo se han considerado los plaguicidas más frecuentemente detectados. Se han llevado a cabo dos muestreos, uno al principio y otro al final de la campaña de recolección.

Tabla 37. Resultados del análisis de residuos de plaguicidas en aceituna y muestras de agua de lavado.

	Aceituna lavada (Kg)	Nivel de sólidos (g L ⁻¹)	Concentración de plaguicidas (mg kg ⁻¹)			
			Diuron	Terbutilazina	Oxifluorfen	Endosulfan sulfato
			AAL/ADL/AL	AAL/ADL/AL	AAL/ADL/AL	AAL/ADL/AL
1 ^{er} Muestreo	2149	2.0	0.007/<LQ/3.66	0.013/<LQ/3.76	0.002/ND/N	ND/ND/ND
	39089	3.5	0.003/ND/12.79	0.023/<LQ/21.41	0.086/ND/N	0.004/0.003/N
	75774	16.0	0.018/0.031/23.70	0.023/0.066/18.8	0.086/ ND/	0.004/ND/ND
2 ^o Muestreo	1552	8.0	0.397/0.021/19.83	0.303/0.037/15.3	ND/ND/ND	0.010/0.007/N
	25286	17.0	0.008/0.016/23.25	0.285/0.136/19.1	0.045/0.005/	ND/ND/ND
	46470	23.4	0.081/0.068/26.15	0.148/0.116/28.2	0.034/0.009/	ND/ND/ND

AAL: Aceituna Antes del Lavado

ADL: Aceituna Después del Lavado

AL: Agua de Lavado

En general, se comprueba como el lavado reduce la concentración de diuron, terbutilazina y oxifluorfen en aceituna, principalmente al principio del ciclo de lavado. Sin embargo, a medida que aumenta la cantidad de aceituna lavada, la eficiencia del proceso de lavado disminuye, especialmente para diuron y terbutilazina. En algunos casos, la aceituna incluso se contamina con estos dos herbicidas en la lavadora como muestra el hecho de que los niveles de residuos en la aceituna lavada son mayores que los que presenta esta misma aceituna antes de lavarse. Se observa también como el endosulfan sulfato y el oxifluorfen se cuantifican en la aceituna pero no en las muestras de agua. Este hecho está en consonancia con sus bajas solubilidades en agua. Sin embargo, la eficacia del lavado es muy diferente para estos dos compuestos. Los niveles de endosulfan sulfato son más bajos y la reducción debida al lavado es insignificante. A diferencia del endosulfan sulfato, los residuos de oxifluorfen se eliminan eficientemente incluso al final del ciclo de lavado.

La razón de este diferente comportamiento podría ser el mecanismo de cómo la aceituna se contamina con estos dos compuestos. La aceituna se contamina con endosulfan cuando todavía está en el árbol, debido a la pulverización y a su transporte aéreo. Como consecuencia

de su marcado carácter lipofílico (de acuerdo con su relativamente baja $K_{O/W}$), el endosulfan probablemente penetra a través de las grasas epicuticulares y por esta razón no se puede lavar. Sin embargo, el mecanismo más posible de contaminación de aceituna con oxifluorfen es el mismo que para otros herbicidas, el contacto con el suelo contaminado. El oxifluorfen se adsorbe muy bien en la mayoría de los suelos y una vez que es adsorbido en las partículas de suelo no se elimina fácilmente¹⁴⁰. Como el oxifluorfen está fuertemente unido al suelo, no está disponible para penetrar en la aceituna. La contaminación superficial con oxifluorfen es, por lo tanto eliminada eficientemente junto con el suelo en la lavadora de aceituna. La eficiencia del proceso de lavado para este herbicida no disminuye tanto como ocurre para diuron y terbutilazina debido a que el oxifluorfen siempre permanece adsorbido sobre las partículas del suelo debido a su baja solubilidad en agua.

En el segundo muestreo, al final de campaña, las muestras de agua tenían una mayor cantidad de sólidos en suspensión que en el primero a pesar de que se procesó una menor cantidad de aceituna. Esta aceituna estaba más contaminada. Esto se debe a que la aceituna está más madura al final de la campaña y probablemente ha estado en el suelo más tiempo, especialmente durante las lluvias. Ello provoca un deterioro de la piel del fruto, por lo que la pulpa también entra en contacto con el suelo y más cantidad de suelo acompaña a la aceituna recogida. También es interesante comprobar como una pequeña cantidad de aceituna muy contaminada puede rápidamente aumentar los niveles de residuos de plaguicidas en el agua de lavado, disminuyendo así su eficiencia, como sucede para diuron y terbutilazina.

5.2 Optimización del proceso de descontaminación del agua de lavado

Los resultados obtenidos en el punto anterior han demostrado que se alcanzan altos niveles de contaminación en el agua de las lavadoras de aceituna y que esto hace que haya casos en los

¹⁴⁰ L. Scrano, S.A. Bufo, T.R.I Cataldi, T.A. Albanis, *J. Environ. Qual.* 33 (2004) 605.

que la aceituna se contamina durante el proceso de limpieza. Debido a la escasez de lluvia en las regiones mediterráneas, el agua que se consume en las almazaras está limitada y por consiguiente, el agua de las lavadoras (alrededor de 20000 litros) no se puede reemplazar tan a menudo como sería deseable. Una alternativa sería reciclar esa agua después del tratamiento apropiado, no sólo para eliminar los sólidos en suspensión sino también los residuos de plaguicidas. Hasta la fecha no se han propuesto métodos de purificación de aguas residuales provenientes de almazaras, en donde se pretende eliminar simultáneamente los lodos que acompañan a esta agua junto con los restos de plaguicidas procedentes del lavado de la aceituna. En esta sección se propone, optimiza y evalúa un método para el tratamiento de este agua residual a escala de laboratorio basado en el uso de coagulantes/floculantes y un material adsorbente.

Para llevar a cabo este estudio, se fortificó agua del grifo con $20 \mu\text{g L}^{-1}$ con los cinco plaguicidas más frecuentemente encontrados en las aguas de lavado: diuron, terbutilazina, oxifluorfen, endosulfan y endosulfan sulfato. En todos los casos y para simular las condiciones reales en las almazaras, se recogió suelo de un olivar y se añadían 15 g a 1 litro de agua. Se seleccionó esta cantidad considerando la situación más desfavorable en la lavadora (10-15% de suelo acompañando a la aceituna cosechada). El agua, junto con la tierra, se homogeneizaba con la ayuda de un agitador magnético (a 900 r.p.m.) durante 10 minutos.

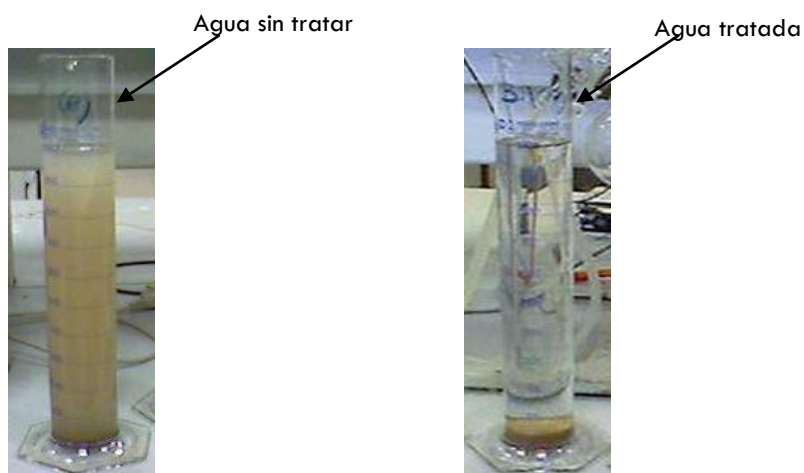
5.2.1 Selección del agente coagulante

La coagulación/floculación es uno de los tratamientos físico-químicos ampliamente aplicado al tratamiento de agua residual. Está basado en la separación de suspensiones de coloides estables del agua mediante la agregación de sustancias adecuadas para formar partículas más grandes. La coagulación se define como el proceso de desestabilización de las partículas coloidales, especialmente mediante la neutralización de su carga eléctrica. La floculación es la agregación de las partículas descargadas cuando se ponen en contacto para formar flóculos.

Se probaron los dos coagulantes que se usan normalmente en el tratamiento de aguas: $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y FeCl_3 . Inicialmente se usaron las siguientes cantidades de cada uno: 200 mg de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y 300 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ para 1 litro de agua contaminada de acuerdo con los datos disponibles para el tratamiento de agua residual para áreas urbanas (100-300 and 100-500 g m^3 , respectivamente dependiendo del estado del agua residual y de los requerimientos de calidad del agua después del tratamiento).

Las muestras de agua, previamente contaminadas, se adicionaban a una probeta (40 mm de diámetro y 300 mm de altura), se añadía la suspensión del coagulante, se mezclaba la dispersión lentamente durante 1 minuto y se dejaba sedimentar. Se formaba una capa clarificada de líquido en la parte superior de la probeta. La altura de esta capa se medía y se llegó a la conclusión de que 10 minutos eran suficientes para el proceso completo de sedimentación. Después, se decantaban 500 mL y se analizaban. Se llevaron a cabo dos réplicas de cada tratamiento y también se analizaba un blanco (1 L de agua con 15 g de suelo) con cada conjunto de muestras.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se usaba FeCl_3 como coagulante ya que el proceso de coagulación/floculación era más rápido, los flóculos formados eran más grandes y el agua después del tratamiento quedaba transparente. Por el contrario, con $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ se observaba una cierta turbiedad en el agua decantada. En las siguientes imágenes se muestra el efecto del uso del coagulante en un agua con sólidos en suspensión.



Los análisis de las aguas clarificadas revelaron que el uso de estos coagulantes no afectaba a la concentración de plaguicidas. Por esta razón, se debía usar un material adsorbente, que también podría actuar como floculante, para eliminar los plaguicidas de esta agua.

5.2.2 Selección del material adsorbente

Se probaron concentraciones iniciales de 200 mg L^{-1} de carbón activo en polvo y tierras diatomeas (los cuales se consideran también agentes floculantes) añadiéndolos después del agente coagulante (FeCl_3) para eliminar los residuos de plaguicidas del agua fortificada. Con el uso de las tierras diatomeas sólo se observó una pequeña disminución en las concentraciones residuales de plaguicidas. Incluso se llegó a aumentar concentración hasta los 20 g L^{-1} , como se muestra en la siguiente Figura:

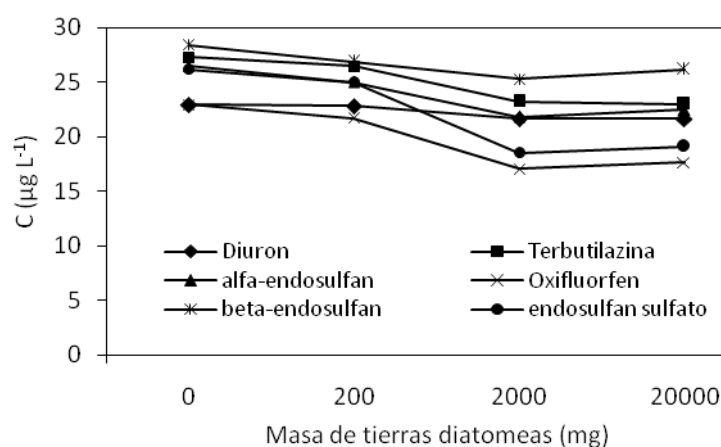


Figura 84. Variación de la concentración de plaguicidas en función de la masa de tierras diatomeas.

Por el contrario, se observó una gran disminución en la concentración de plaguicidas cuando se añadía carbón activo a las muestras de agua fortificadas. Se probaron diferentes concentraciones (20-2000 ng L⁻¹) y los resultados se muestran en la Figura 85:

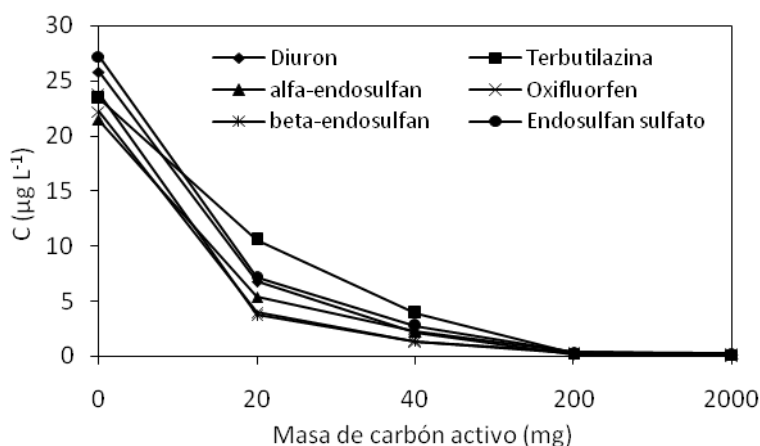


Figura 85. Variación de la concentración de plaguicidas en función de la masa de carbón activo.

Como se puede observar, se consigue una eliminación total de los residuos de plaguicidas con 200 mg L⁻¹ de este material adsorbente por litro de agua.

Asimismo, se llevó a cabo un estudio adicional de la influencia del orden de adición:

- (1) El coagulante y el adsorbente (floculante) a la misma vez.
- (2) El coagulante primero y después el adsorbente (floculante).
- (3) El coagulante primero seguido de un proceso de filtración para eliminar los flóculos y la posterior adición del adsorbente al filtrado.

La eliminación de los plaguicidas era menos eficiente con la adición simultánea del coagulante y el adsorbente, especialmente para la terbutilazina y endosulfan (isómeros α y β). Los resultados obtenidos añadiendo primero el coagulante y después el adsorbente eran similares con y sin el paso intermedio de filtración. En ambos casos todos los residuos de plaguicidas se eliminaban completamente, por lo que se optó por la adición secuencial del coagulante y el adsorbente.

VI. Conclusiones y perspectivas

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- (1) Se han puesto a punto y validado diferentes técnicas para el análisis de treinta y dos plaguicidas en aguas procedentes de las lavadoras de aceituna en almazaras mediante CG-MS/MS y CG-ECD/TSD. El uso de SPE permite la extracción y preconcentración de los plaguicidas del agua de lavado de aceituna, que contiene una cantidad significativa de aceite. Los métodos han sido aplicados satisfactoriamente a la determinación de plaguicidas en diferentes muestras de agua recogidas directamente a la entrada y a la salida de las lavadoras de tres almazaras seleccionadas para el estudio. Los residuos de plaguicidas encontrados más frecuentemente son: terbutilazina, simazina y diuron.
- (2) Se ha desarrollado y validado un método para la determinación simultánea de cinco herbicidas usados en el olivar: diuron, simazina, atrazina, terbutilazina y terbutrina, en muestras de suelo y lodo procedentes de lavadoras de aceituna. La extracción de los herbicidas de las muestras de suelo se ha llevado a cabo mediante extracción líquido-líquido con una mezcla ciclohexano/acetona con sonicación. Además, fue necesario aplicar un proceso de clean-up adicional mediante SPE. Los plaguicidas se determinan en los extractos mediante CG-ECD y CG-TSD. Los herbicidas detectados más frecuentemente en las muestras de lodo fueron diuron y terbutilazina.
- (3) Se ha desarrollado un método analítico multiresiduo para el análisis de treinta y dos plaguicidas organoclorados, organofosforados, organonitrogenados, etc. en aceite de oliva. El método consiste en una extracción de los plaguicidas del aceite. Los extractos se someten después a un proceso de clean-up, basado en cromatografía de permeación en geles (GPC), para separar los plaguicidas de baja masa molecular de los triglicéridos del aceite de mayor masa molecular. Los plaguicidas se determinan en el extracto final mediante CG-MS/MS y CG-ECD/TSD. Se evitaron algunos problemas surgidos de interferencias que coeluyan con algunos plaguicidas en el análisis con CG-ECD mediante el uso de CG-MS/MS. Se ha posibilitado la determinación sensible y selectiva de estos plaguicidas a muy bajos niveles de concentración, lo cual es un paso

significativo debido a la urgente necesidad de análisis de estos analitos en matrices tan complejas.

El método basado en CG-MS/MS se aplicó también al análisis de una muestra de aceite de oliva de un ensayo interlaboratorio fortificada con plaguicidas organoclorados. Todos los resultados obtenidos estaban dentro del intervalo especificado "satisfactorio".

- (4) Igualmente, se ha propuesto un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en aceituna. Se ha optimizado un procedimiento de extracción con el empleo de un disolvente orgánico, siendo éste más rápido que el aislamiento del aceite con el método Abencor. Ambos métodos proporcionan resultados similares. Se han empleado tres sistemas de detección: CG-MS/MS y CG-ECD/TSD. El uso del detector MS/MS ha probado su capacidad para aumentar la selectividad de la detección y cuantificación, incluyendo información cuantitativa importante para la confirmación de los resultados. Los bajos valores de LD obtenidos demuestran que estos métodos se pueden usar para detectar plaguicidas a niveles de concentración por debajo de los LMR establecidos por la UE. Además, los métodos desarrollados son versátiles, puesto que se pueden determinar simultáneamente varios grupos de plaguicidas con diferentes propiedades químicas. Este método es de especial relevancia dada la escasez de procedimientos de análisis de aceituna descritos hasta la fecha y la necesidad de este tipo de análisis puesto que la entrada de aceituna contaminada en las almazaras constituye un Punto Crítico de Control.
- (5) Se ha llevado a cabo el estudio del comportamiento de cuatro plaguicidas (diuron, terbutilazina, simazina y los isómeros α y β del endosulfan) frente al lavado durante un periodo de diez semanas. Cuando se trata de una contaminación reciente, el lavado elimina los plaguicidas de forma efectiva, especialmente la simazina. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo desde la contaminación aumenta la fracción de plaguicidas que no es posible eliminar de la aceituna, probablemente debido a su retención en las ceras cuticulares. A partir de la sexta semana, la concentración de plaguicidas detectada en aceituna lavada disminuye, posiblemente debido a su

degradación. Por consiguiente, el proceso de lavado de la aceituna en las almazaras podría ser efectivo eliminando aquellos residuos presentes en la aceituna como consecuencia del contacto con los plaguicidas durante un breve periodo de tiempo. Esto ocurre únicamente cuando el fruto recién derribado del árbol se recoge del suelo mediante cepillos y sopladoras.

- (6) Se ha investigado la influencia de los procesos preliminares en la producción de aceite de oliva en la presencia de residuos de plaguicidas en aceituna y aceite de oliva. Los resultados demuestran la influencia decisiva del método de recogida de la aceituna en la concentración de residuos de herbicidas, significativamente mayor en la aceituna de suelo. Se ha demostrado que el lavado puede eliminar eficientemente la contaminación superficial con herbicidas (diuron y terbutilazina) detectada en las aceitunas de suelo. No se observa por el contrario disminución de los niveles de endosulfan. Asimismo, los resultados encontrados parecen indicar que puede producirse la contaminación de aceituna libre de residuos en la almazara a partir de otra que se encuentra contaminada. Por ello, la aceituna recogida del suelo debería siempre procesarse separadamente de la que se ha recogido del árbol, para preservar la calidad del aceite obtenido de ésta última.
- (7) Se ha estudiado la evolución de la contaminación del agua de las lavadoras durante los ciclos de lavado en las almazaras, es decir, desde que se pone el agua limpia en la lavadora hasta que se cambia. Al principio del ciclo de lavado, los residuos de herbicidas detectados (diuron, oxifluorfen y terbutilazina) eran eliminados, mientras que los niveles de endosulfan no se reducían significativamente. Sin embargo, la contaminación progresiva del agua de lavado con residuos de herbicidas disminuía la eficiencia del lavado e incluso se observaba la contaminación de aceituna en las lavadoras. Para evitar este problema se ha propuesto un método de descontaminación de esas aguas de lavado basado en el uso de FeCl_3 como agente coagulante y carbón activo como adsorbente. Este método puede ser de utilidad teniendo en cuenta la escasez de agua de las zonas productoras de aceite de oliva.

VII. Anexo

VI. ANEXO

En este anexo se recogen las contribuciones científicas que se han derivado de esta memoria de investigación. Se resumen en siete artículos publicados en revistas científicas de carácter internacional mientras que otro está pendiente de publicación y se incluye en el formato propio de un artículo de acuerdo con las normas reguladoras (artículo 32.2) de los estudios de Tercer Ciclo y del Título de Doctor por la Universidad de Jaén. También se incluyen dos artículos publicados en revistas nacionales, una de carácter divulgativo (ASAJA) y otra de formato electrónico (Espectroquímica Hoy) así como una patente. Por último se recogen igualmente 8 comunicaciones a congresos.

✓ Artículos

1. "Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry", María Guardia Rubio, Antonio Ruiz Medina, Antonio Molina Díaz, María Luisa Fernández de Córdoba, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1578.
2. "Multiresidue analysis of three groups of pesticides in washing waters from olive processing by solid-phase extraction-gas chromatography with electron capture and thermoionic specific detection", M. Guardia Rubio, A. Ruiz Medina, M.I. Pascual Reguera, M.L. Fernández de Córdoba, *Microchem. J.* 85 (2007) 257.
3. "Determination of triazine herbicides and diuron in mud from olive washing devices and soils using gas chromatography with selective detectors", M. Guardia Rubio, V. Banegas Font, A. Molina Díaz and M.J. Ayora Cañada, *Anal. Letters* 39 (2006) 835.
4. "Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection", María Guardia-Rubio, María Luisa Fernández-de Córdoba, María José Ayora-Cañada, Antonio Ruiz-Medina, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 231.

5. "Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems", M. Guardia-Rubio, R.M. Marchal-López, M.J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 195.
6. "Effect of washing on pesticides residues in olives", M. Guardia-Rubio, M.J. Ayora-Cañada and A. Ruiz-Medina, *Food Chem. Toxicol.* 72 (2007) 139.
7. "Influence of harvesting method and washing on the presence of pesticide residues in olives and olive oil", M. Guardia Rubio, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz and M.J. Ayora Cañada, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8538.
8. "Contamination of washing water with pesticide residues in olive oil mills: effect on olives washing efficiency and decontamination method proposal", M. Guardia-Rubio, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, M.J. Ayora-Cañada, enviado a publicar a *J. Sci. Food Agric.*

✓ **Otras publicaciones**

1. "Evaluación de la efectividad del lavado de aceituna en la eliminación de residuos de plaguicidas con CG-MS/MS", A. Molina Díaz, M. Guardia Rubio, R.M. Marchal López, A. Ruiz Medina, M.J. Ayora Cañada, M.L. Fernández de Córdoba, M.I. Pascual Reguera, *Espectrouímica Hoy* (Gaceta electrónica de información de la sociedad de espectroscopía aplicada) 5 (2004) 3.
2. "Evaluación de la efectividad del lavado de aceituna sobre la eliminación de residuos de plaguicidas: estudio de la situación real en almazaras y propuestas de mejora", M. Guardia Rubio, A. Ruiz Medina, M. José Ayora Cañada, M. Luisa Fernández de Córdoba, M. Isabel Pascual Reguera, A. Molina Díaz, Rosa M. Marchal López, F. Cano Campana, P.J. Vílchez García, *Revista agrícola ganadera* (de ASAJA), 288 (2005) 45.

✓ **Patente**

1. Solicitud de patente de invención con el título: "PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS PROCEDENTES DEL LAVADO DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS" a la Oficina Española de Patentes y Marcas (Ministerio de Industria, Turismo y Comercio) con fecha 11/01/2007.

✓ **Comunicaciones a congresos**

1. "Gas chromatography-tandem mass spectrometry for the evaluation of the olive washing effectiveness in plaguicide residues elimination", *Colloquium Spectroscopicum Internationale* (CSI XXXIII), Granada, Septiembre 2003.
2. "Gas chromatography-tandem mass spectrometry for the multiresidue determination of plaguicide residues in virgin olive oil", *VIII International symposium on analytical methodology in the environmental field, XIII reunion de la Sociedad Española de Química Analítica (VIII ISAMEF/SEQA)*, La Coruña, Septiembre 2003.
3. "Development and comparison of two methods for the multiresidue determination of plaguicide residues in olives using gas chromatography-tandem mass spectrometry", *Euroanalysis XIII*, Salamanca, Septiembre 2004.
4. "Evaluación de la efectividad del lavado de aceituna sobre la eliminación de residuos de plaguicidas: Estudio de la situación real en almazaras y propuestas de mejora" (Comunicación oral), *Expoliva (Feria internacional del aceite de oliva)*, Jaén, Mayo 2005.
5. "Determination of pesticides in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific detection, electro capture detection and tandem mass spectrometry", *IMA 05: Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications*, Iraklion (Grecia), Septiembre 2005.
6. "Influence of harvesting method and washing on the presence of pesticide residues in olives and olive oil", 4th Conference Almería, Almería, Noviembre 2006.

7. "Effect of washing on pesticide residues in olives", 4th Conference Almería, Almería, Noviembre 2006.
8. "Aplicación de la cromatografía de gases, utilizando diferentes sistemas de detección, al análisis de residuos de pesticidas en aceite de oliva", *X Reunión del grupo regional andaluz de la sociedad española de química analítica (GRASEQA 2006)*, Cádiz, Junio 2006.