



**Estudio de residuos de pesticidas en
cultivos de arroz de Uruguay por métodos
analíticos modernos y evaluación de
procesos fotoquímicos para la remediación
de aguas de campo.**

***Trabajo presentado por
Lucía Pareja
para aspirar al título de Doctor en Química.***

***Directores: Profs. Verónica Cesio y Amadeo Rodríguez Fernández-Alba
Director Académico: Prof. Horacio Heinzen***

***Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales,
Facultad de Química, Universidad de la República.
Octubre de 2012, Montevideo, Uruguay.***

"Todas las teorías son legítimas y ninguna tiene importancia.

Lo que importa es lo que se hace con ellas".

J.L. Borges

Para Mamá, Papá y Ana

Para Marcos

Agradecimientos

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a mi familia; a mis Papás, a mis abuelos y a mis tíos, por haberme enseñado que todo en la vida requiere esfuerzo y que tenemos que luchar para conseguir lo que queremos. A mi hermana Analía por ser la mejor hermana del mundo, por acompañarme en todo!

A Marcos, por ser el mejor compañero de vida, el mejor amigo, por apoyarme siempre y porque mucho del tiempo destinado a esta tesis era de él.

Quiero agradecerle a mi Directora de Tesis y amiga Verónica Cesio por su ayuda y dedicación, por los buenos consejos, por haberme acompañado a lo largo de este camino y en muchas otras cosas de la vida. Por todos los retos y mimos que me dio en todo este tiempo.

A Horacio, por su dedicación, por enseñarme a buscar el porqué de las cosas, por contagiarme las ganas de buscar siempre "alguna pruebita más para hacer" y por creer en mí.

A Amadeo R. Fernández-Alba, co-Director de esta tesis por darme la oportunidad de trabajar y aprender en un grupo de investigación de primera. Por sus buenos consejos, por transmitirme sus ganas y conducta para el trabajo.

A todo el grupo de Investigación de Residuos de Plaguicidas de la Universidad de Almería: Ana Lozano, Ana Agüera, Samantha, Ana Uclés, Octavio, Carmen, Milagros y May por su apoyo en los casi 3 años que estuve trabajando con ellos.

En especial a Paula por su amistad, por todas las charlas compartidas, por todos los paseos que disfrutamos, por hacerme sentir en casa estando tan lejos.

A Noe, Inma y Sonia por todos esos momentos lindos que compartimos y que voy a recordar siempre.

Agradecimientos

A Antonio por los mil momentos que vivimos, por enseñarme a querer a Almería, por los ratos en el Café París. Por compartir su guitarra y su voz conmigo.

A Chusa, por su amistad, por su buena onda y por su paciencia para enseñarme a usar el QTRAP.

To Bela for all the hours we worked on the QqQ, for all the time we spent together in Almeria that I will never forget.

A Tania mi amiga de siempre, por regalarme su amistad, porque sabemos que contamos con la otra incondicionalmente.

A Ceci por haber estado siempre conmigo, aprendiendo de la vida juntas. Por haberme regalado el placer de tener una ahijada divina.

A Sol, por compartir su luz y alegría conmigo

A Cecilia, Gonzalo y Fiorella porque junto a ellos llegue hasta acá, agradecerles el haber estado ahí siempre, juntos. A Leticia porque sin ella no somos el grupete!, Por ponerle el tono de locura que le da el gustito a la vida.

A María, por todos los viajes y conciertos que compartimos, por estar pendiente de mi desde la distancia.

A Inés, Vero y Flo, por todos los años compartidos, por las salidas, los mates, porque a pesar de que nos vemos poquito siempre están ahí.

A Daniela, Florencia, Eugenia, Ma Noel, Jessica, Carla, Natalia, Cecilia y Andrea por su linda amistad. Por todos los "té" que compartimos en los 13 años juntas.

Agradecimientos

A Raquel y Ricardo por cuidarme, por compartir su casa y su vida "Almeriense" conmigo, por hacerme sentir parte de su familia. Porque sé que esperan con ilusión una visita mía.

A Simone y Tizziana por recibirme en su casa siempre con una sonrisa, por contagiarme esa felicidad que siempre tienen y por su cariño.

A Mica y Lara por ese año loco que vivimos juntas en Granada 86, por las salidas de los martes, por las risas, que hacían que el tiempo pasara mucho más rápido.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Farmacognosia por hacer que el día a día fuese ameno y divertido. A Joaquín, Fernanda, Fede y Sebastián, a Nacho, Xime, Majo, Naty, Carlos, Lucia G, Gabriel, Stefi, Germán, Naty G, Carlos, Eduardo, Cris, Alejandro, Pilar y Anita. En especial a Álvaro, por ser mi compañero de las mañanas, por su música y sus consejos. A Daniel, por su ayuda constante en todos los temas instrumentales!

A Ani, por su alegría y calidez. Por las horas compartidas luchando con el endosulfán.

A Silvina por ser mi amiga, por las mil horas compartidas dentro y fuera del laboratorio, porque parte de esta tesis es suya y por el aguante de este último tiempo.

A Andrés por su amistad, por todas las horas de laboratorio compartidas, acá y en Almería. Por los buenos consejos y por escucharme en los momentos críticos!!! Por enseñarme mil cosas que me facilitaron la escritura de la tesis.

A Jenny por darme un lugar en su oficina para escribir esta tesis.

Agradecimientos

A Claudio, Bernardo y Santiago por su ayuda técnica y logística.

A Miguel Gamón y María Ros del Laboratorio Agroalimentario de la Generalitat Valenciana por los muestreos de agua en la región de la Albufera, por las fotos y toda la información que me brindaron.

I would like also to thank Steven Lehotay for his good advices regarding the QuEChERS method.

A mis compañeros del Polo Agroalimentario, Nico, Guille, Gastón, por su paciencia y buena onda. A Vivi por ese humor que contagia las ganas de reírse! A todos mis compañeros del CUP por su recibimiento en Paysandú. En especial a Liber por su ayuda, a Selene y Patricia por las charlas compartidas.

A Laura, Gabriela y a Nelly por facilitarme siempre todas las gestiones administrativas.

Al Centro Universitario por ceder horas de mi trabajo para el desarrollo de esta tesis. En especial a Margarita por su apoyo y recibimiento en Paysandú.

A todos los organismos e instituciones que me financiaron de una u otra forma e hicieron que este trabajo fuera posible: PEDECIBA, ANII (BE_POS_2010_2564, BE_POS_2009_807), AECID, CSIC, AUIP, DICYT, ACA e INIA.

A todos, mil gracias!!

Índice General

1.	Resumen	1
Introducción		
2.	Generalidades	4
2.1.	<i>Producción de Arroz en Uruguay.</i>	9
3.	Pesticidas	14
3.1.	<i>Definición de pesticida</i>	14
3.2.	<i>Historia de los pesticidas</i>	16
3.3.	<i>Clasificación de los pesticidas</i>	19
3.4.	<i>Destino de los pesticidas</i>	23
4.	Ecosistema del Cultivo de Arroz	24
4.1.	<i>Suelo</i>	25
4.1.1.	<i>Características del suelo</i>	28
4.1.1.1.	<i>Textura</i>	28
4.1.1.2.	<i>pH</i>	29
4.1.1.3.	<i>Legislación sobre protección del suelo</i>	30
4.2.	<i>Agua</i>	32
4.2.1.	<i>Agua en el ecosistema del arroz</i>	32
4.2.2.	<i>Legislación sobre protección del agua</i>	33
4.3.	<i>Arroz</i>	36
4.3.1.	<i>Origen e historia</i>	36
4.3.2.	<i>Especies de arroz</i>	37
4.3.3.	<i>Tipos de cultivo</i>	37
4.3.4.	<i>Requerimientos edafoclimáticos</i>	38
4.3.4.1.	<i>Clima</i>	38
4.3.4.1.1.	<i>Temperatura</i>	38
4.3.4.2.	<i>Suelo</i>	39
4.3.5.	<i>Morfología y taxonomía</i>	39
4.3.6.	<i>Variedades de arroz</i>	41
4.3.7.	<i>Procesamiento del arroz</i>	41
4.3.7.1.	<i>Composición del arroz paddy y los principales productos luego de su procesamiento</i>	43
4.3.8.	<i>Particularidades del cultivo</i>	44
4.3.8.1.	<i>Preparación del terreno</i>	44
4.3.8.2.	<i>Siembra</i>	45
4.3.8.3.	<i>Riego</i>	46
4.3.8.4.	<i>Cosecha</i>	46
4.3.8.5.	<i>Secado y almacenamiento</i>	47
4.3.9.	<i>Plagas y enfermedades</i>	47
4.3.9.1.	<i>Malezas</i>	47
4.3.9.2.	<i>Enfermedades</i>	50
4.3.9.2.1.	<i>Enfermedades producidas por hongos</i>	51
4.3.9.2.2.	<i>Enfermedades producidas por bacterias</i>	52
4.3.9.2.3.	<i>Enfermedades producidas por virus</i>	52
4.3.9.2.4.	<i>Enfermedades producidas por nematodos</i>	53
4.3.9.3.	<i>Insectos</i>	53
4.3.10.	<i>Usos de agroquímicos en cultivos de arroz</i>	56
4.3.10.1	<i>Efectos de los Agroquímicos durante el procesamiento del arroz</i>	58
4.3.11.	<i>Legislación sobre Pesticidas en Alimentos</i>	60
4.3.12.	<i>Ocurrencia de Pesticidas en Arroz a Nivel Mundial</i>	63
5.	Análisis de Residuos de Pesticidas	66
5.1.	<i>Análisis de pesticidas en muestras ambientales</i>	66
5.1.1.	<i>Análisis de pesticidas en suelo</i>	66
5.1.2.	<i>Análisis de pesticidas en agua</i>	67
5.2.	<i>Análisis de residuos de pesticidas en alimentos</i>	68
5.2.1.	<i>Métodos MRM de extracción y clean-up para residuos de pesticidas</i>	69

5.2.1.1.	Procedimientos de extracción con solventes; Extracción Sólido-Líquido (SLE) y Líquido-Líquido (LLE)	69
5.2.1.1.1.	Breve historia de los métodos MRM	70
5.2.1.2.	Métodos de extracción mediante adsorción	72
5.2.1.2.1.	Extracción en Fase Sólida (SPE)	72
5.2.1.2.2.	Extracción Dispersiva en Fase Sólida (dSPE)	75
5.2.1.2.2.1.	QuEChERS (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)	75
5.3.	Aplicaciones de Análisis de Pesticidas en las Matrices Seleccionadas	77
5.3.1.	Suelo	77
5.3.2.	Agua	80
5.3.3.	Arroz	83
6.	Técnicas Instrumentales de Análisis	86
6.1.	Modos de trabajo en espectrometría de masas	87
6.2.	Cromatografía gaseosa con detector de masas (GC-MS)	87
6.2.1.	Modos de ionización	88
6.2.1.1.	Impacto electrónico	88
6.2.1.2.	Ionización química	89
6.2.2.	Analizadores	89
6.2.2.1.	Cuadrupolo	90
6.2.2.2.	Trampa de iones	91
6.3.	Cromatografía líquida	92
6.3.1.	Cromatografía líquida con Detector de Arreglo de Diodos (LC-DAD)	92
6.3.2.	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)	93
6.3.2.1.	Sistemas de ionización	93
6.3.2.1.1.	Ionización a Presión Atmosférica (API)	94
6.3.2.1.1.1.	Electrospray (ESI)	94
6.3.2.1.1.2.	Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)	95
6.3.3.	Analizadores	95
6.3.3.1.	Analizador triple cuadrupolo	96
6.3.3.2.	Analizador de tiempo de vuelo	97
6.3.3.3.	Sistemas híbridos	99
6.3.3.3.1.	LC-QLIT/MS	100
6.3.3.3.2.	LC-QTOF/MS	101
6.4.	Aplicación de Técnicas Cromatográficas para el Análisis de Residuos de Pesticidas en Suelo, Agua y Arroz	102
7.	Validación de Métodos Analíticos	105
7.1.	Parámetros de validación de métodos analíticos	105
7.2.	Criterios para la identificación y confirmación de residuos de pesticidas según DG SANCO	110
7.2.1.	Requisitos en cromatografía	110
7.2.2.	Requisitos en espectrometría de masas	110
8.	Degradación de Contaminantes Orgánicos en Agua Mediante Procesos de Oxidación Avanzados	112
8.1.	Fotólisis	112
8.2.	Fotocatálisis solar	112
8.2.1.	Fotocatálisis heterogénea	113
8.2.2.	Fotocatálisis homogénea	116
Objetivos		
9.	Objetivos Generales.	118
9.1.	Objetivos específicos	118
Experimental		
10.	Materiales y Métodos	121
10.1.	Materiales y Reactivos	121
10.2.	Instrumental	123
10.2.1.	Equipos de cromatografía líquida	123
10.2.2.	Equipos de cromatografía gaseosa (GC-MS)	126
10.3.	Equipos	127
10.4.	Preparación de soluciones stock	128
10.5.	Métodos cromatográficos para Análisis de Residuos de Pesticidas	130

10.5.1.	Método Cromatográfico para Análisis de Residuos de herbicidas mediante en LC-DAD (método A)	130
10.5.2.	Método Cromatográfico para Análisis de Residuos de Pesticidas mediante LC-QqQ/MS (método B)	132
10.5.3.	Método Cromatográfico para Análisis del efecto matriz mediante LC-TOF/MS (método C)	139
10.5.4.	Método Cromatográfico para Análisis de Residuos de Pesticidas mediante LC-QLIT/MS (método D)	140
10.5.4.1.	Condiciones del modo IDA (Information-Dependent-Acquisition)	142
10.5.5.	Análisis de quinclorac y sus productos de transformación luego de la remediación química mediante LC-QTOF/MS (método E)	146
10.5.6.	Método Cromatográfico para Análisis de Residuos de Pesticidas mediante GC-MS (método F)	147
10.6.	Muestreo	148
10.7.	Validación de Métodos de Análisis de Pesticidas en Suelo, Agua y Grano de Arroz	155
10.7.1.	Identificación y confirmación	155
10.7.2.	Recuperación	156
10.7.2.1.	Muestra blanco	156
10.7.2.2.	Ensayo de fortificación	157
10.7.3.	Repetitividad y Reproducibilidad	157
10.7.4.	Linealidad	157
10.7.5.	LOD & LOQ	158
10.7.6.	Efecto matriz	158
11.	Suelo	161
11.1.	Tratamiento de Muestra	161
11.2.	Validación de Métodos de Análisis de Herbicidas en Suelo Mediante LC-DAD	161
11.2.1.	Determinación del % de recuperación	161
11.2.1.1.	Ensayo de fortificación	161
11.2.2.	Repetitividad y Reproducibilidad	161
11.2.3.	Linealidad	161
11.2.4.	LOD & LOQ	161
11.2.5.	Métodos de extracción y clean-up	162
11.2.6.	Análisis cromatográfico	163
11.2.7.	Análisis de muestras reales	163
12.	Agua de cultivos de arroz	165
12.1.	Tratamiento de Muestra	165
12.2.	Validación de Métodos de Análisis de Herbicidas en Agua de Cultivos de Arroz Mediante LC-DAD	165
12.2.1.	Determinación del % de recuperación	165
12.2.1.1.	Ensayo de fortificación	165
12.2.2.	Repetitividad y Reproducibilidad	165
12.2.3.	Linealidad	165
12.2.4.	LOD & LOQ	166
12.2.5.	Métodos de extracción y clean-up	166
12.2.6.	Análisis cromatográfico	166
12.2.7.	Análisis de muestras reales	166
12.3.	Validación de Métodos de Análisis de Pesticidas en Agua de Cultivos de Arroz Mediante LC-QqQ/MS	167
12.3.1.	Determinación del % de recuperación	167
12.3.1.1.	Ensayo de fortificación	167
12.3.2.	Repetitividad y Reproducibilidad	167
12.3.3.	Linealidad	167
12.3.4.	Efecto matriz	167
12.3.5.	LOD & LOQ	168
12.3.6.	Métodos de extracción y clean-up	168
12.3.7.	Análisis cromatográfico	168
12.4.	Validación de Método de Análisis de Pesticidas en Agua de Cultivos de	169

	<i>Arroz Mediante LC-QLIT/MS</i>	
12.4.1.	<i>Determinación del % de recuperación</i>	169
12.4.1.1.	<i>Ensayo de fortificación.</i>	169
12.4.2.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	169
12.4.3.	<i>Linealidad</i>	169
12.4.4.	<i>Efecto matriz</i>	169
12.4.5.	<i>LOD & LOQ</i>	169
12.4.6.	<i>Método de análisis</i>	170
12.4.7.	<i>Análisis cromatográfico</i>	170
12.4.8.	<i>Análisis de muestras reales</i>	170
13.	Arroz	172
13.1.	<i>Tratamiento de muestra</i>	172
13.2.	<i>Validación de Métodos de Análisis de Herbicidas en Arroz Blanco Mediante LC-DAD</i>	172
13.2.1.	<i>Determinación del % de recuperación</i>	172
13.2.1.1.	<i>Ensayo de fortificación.</i>	172
13.2.2.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	172
13.2.3.	<i>Linealidad</i>	172
13.2.4.	<i>LOD & LOQ</i>	173
13.2.5.	<i>Métodos de extracción y clean-up</i>	173
13.2.6.	<i>Análisis cromatográfico</i>	176
13.2.7.	<i>Análisis de muestras reales</i>	176
13.3.	<i>Validación de Métodos de Análisis de Residuos de Pesticidas en Arroz Blanco Mediante LC-QqQ/MS</i>	176
13.3.1.	<i>Determinación del % de recuperación</i>	176
13.3.1.1.	<i>Ensayo de fortificación</i>	176
13.3.2.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	176
13.3.3.	<i>Linealidad</i>	177
13.3.4.	<i>Efecto matriz</i>	177
13.3.5.	<i>LOD & LOQ</i>	177
13.3.6.	<i>Métodos de extracción y clean-up</i>	177
13.3.7.	<i>Análisis cromatográfico</i>	181
13.3.8.	<i>Análisis de muestras reales</i>	181
13.4.	<i>Validación de Métodos de Análisis de Residuos de Pesticidas en Arroz Paddy Mediante LC-QqQ/MS</i>	181
13.4.1.	<i>Determinación del % de recuperación</i>	181
13.4.1.1.	<i>Ensayo de fortificación</i>	181
13.4.2.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	181
13.4.3.	<i>Linealidad</i>	181
13.4.4.	<i>Efecto matriz</i>	182
13.4.5.	<i>LOD & LOQ</i>	182
13.4.6.	<i>Métodos de extracción y clean-up</i>	182
13.4.7.	<i>Análisis cromatográfico</i>	184
13.4.8.	<i>Análisis de muestras reales</i>	184
	Residualidad de pesticidas en el procesamiento del arroz	
	Estudio de la Distribución de Residuos de Pesticidas Aplicados en	
14.	Condiciones Controladas en Campo, en Diferentes Productos Obtenidos Durante el Procesamiento de Arroz	186
14.1.	<i>Experimento en campo</i>	186
14.1.1.	<i>Preparación del arroz tratado</i>	186
14.1.2.	<i>Preparación de la matriz "blanco"</i>	188
14.2.	<i>Experimentos de laboratorio</i>	188
14.2.1.	<i>Preparación de la muestra</i>	188
14.3.	<i>Validación de las metodologías de Análisis</i>	189
	Procesos de oxidación avanzada	
15.	Degradación del Quinclorac Mediante Fotólisis Directa y Fotocatálisis en Diferentes Sistemas Acuosos	191
15.1.	<i>Agua utilizada</i>	191
15.2.	<i>Soluciones stock</i>	191

15.3.	<i>Determinación del Carbono Orgánico Disuelto (COD)</i>	191
15.4.	<i>Experimentos de hidrólisis</i>	191
15.5.	<i>Experimentos de fotólisis directa</i>	192
15.6.	<i>Experimentos de fotocátalisis solar</i>	193
15.7.	<i>Tratamiento de las muestras mediante SPE</i>	194

Resultados y Discusión

Suelo		
16.	Análisis de Herbicidas en Suelo	197
16.1.	<i>Justificación y objetivos</i>	197
16.2.	<i>Desarrollo de metodología para análisis de herbicidas en suelo mediante LC-DAD</i>	198
16.2.1.	<i>Selección de los herbicidas</i>	198
16.2.2.	<i>Optimización de las condiciones cromatográficas</i>	198
16.2.3.	<i>Tipos de suelo seleccionados</i>	200
16.2.4.	<i>Validación de la metodología</i>	201
16.2.4.1.	<i>Estudio de recuperación</i>	201
16.2.4.2.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	203
16.2.4.3.	<i>Linealidad</i>	203
16.2.4.4.	<i>LOD y LOQ</i>	203
16.3.	<i>Aplicación de las metodologías desarrolladas en otros tipos de suelo.</i>	204
16.4.	<i>Análisis de muestras reales</i>	206
16.5.	<i>Conclusiones de los resultados obtenidos durante el desarrollo de un método para el análisis de herbicidas en suelo</i>	207
Agua		
17.	Análisis de pesticidas en agua	209
17.1.	<i>Justificación y objetivos</i>	209
17.2.	<i>Desarrollo de metodologías para el análisis de herbicidas en agua de cultivos de arroz mediante LC-DAD</i>	209
17.2.1.	<i>Selección de los compuestos estudiados</i>	209
17.2.2.	<i>Validación de la metodología</i>	209
17.2.2.1.	<i>Método de extracción y clean-up</i>	209
17.2.2.2.	<i>Estudio de Recuperación</i>	211
17.2.2.3.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	213
17.2.2.4.	<i>Linealidad</i>	214
17.2.2.5.	<i>LOD y LOQ</i>	216
17.2.2.6.	<i>Análisis de muestras reales</i>	216
17.2.3.	<i>Conclusiones parciales de los resultados obtenidos durante el desarrollo de herbicidas en agua mediante LC-DAD</i>	217
17.3.	<i>Validación de métodos de análisis de pesticidas en agua de cultivos de arroz mediante LC-QqQ/MS</i>	218
17.3.1.	<i>Selección de los pesticidas</i>	218
17.3.2.	<i>Optimización de las condiciones cromatográficas</i>	219
17.3.3.	<i>Optimización de las condiciones SRM</i>	219
17.3.4.	<i>Validación de la metodología</i>	221
17.3.4.1.	<i>Método de extracción y clean-up</i>	221
17.3.4.2.	<i>Estudio de Recuperación</i>	222
17.3.4.3.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	224
17.3.4.4.	<i>LOD y LOQ</i>	224
17.3.4.5.	<i>Linealidad</i>	224
17.3.4.6.	<i>Efecto Matriz</i>	228
17.3.4.7.	<i>Especificidad</i>	229
17.3.4.8.	<i>Ensayo de dilución de la matriz</i>	230
17.4.	<i>Conclusiones parciales de este trabajo</i>	230
17.5.	<i>Validación de método de análisis de pesticidas en agua de cultivos de arroz mediante LC-QLIT/MS</i>	231
17.5.1.	<i>Selección de los pesticidas</i>	231
17.5.2.	<i>Optimización de las condiciones cromatográficas</i>	232
17.5.3.	<i>Optimización de las condiciones SRM</i>	232
17.5.4.	<i>Condiciones del modo IDA (Information-Dependent-Acquisition)</i>	233

17.5.5.	Método de análisis	234
17.5.5.1.	Preparación de la muestra	234
17.5.6.	Selección del modo de trabajo: Modo Estándar y Modo Scheduled	235
17.5.6.1.	LOD y LOQ	236
17.5.6.2.	Número de puntos usados para el pico cromatográfico	237
17.5.7.	Validación de la metodología	242
17.5.7.1.	Repetitividad y Reproducibilidad	242
17.5.7.2.	Linealidad	242
17.5.7.3.	Efecto Matriz	242
17.5.7.4.	Especificidad	242
17.5.7.5.	Análisis de muestras reales	245
17.6.	Conclusiones parciales de este trabajo	247
	Arroz	
18.	Análisis de pesticidas en arroz	249
18.1.	Justificación y objetivos	249
18.2.	Desarrollo de metodología para análisis de herbicidas en arroz mediante LC-DAD	249
18.2.1.	Validación de la metodología	250
18.2.1.1.	Métodos de extracción y clean-up	250
18.2.1.2.	Estudio de Recuperación	252
18.2.1.3.	Repetitividad y Reproducibilidad	253
18.2.1.4.	LOD y LOQ	253
18.2.1.5.	Linealidad	253
18.2.1.6.	Análisis de muestras reales	254
18.2.2.	Conclusiones parciales de este trabajo	254
18.3.	Validación de método de análisis de pesticidas en arroz blanco mediante LC-QqQ/MS	255
18.3.1.	Selección de los pesticidas	255
18.3.2.	Validación de las metodologías en arroz blanco	255
18.3.2.1.	Selección de la cantidad de muestra	255
18.3.2.2.	Ensayos de Recuperación	257
18.3.2.3.	Métodos de extracción y clean-up	257
18.3.2.4.	Repetitividad y Reproducibilidad	262
18.3.2.5.	LOD y LOQ	262
18.3.2.6.	Linealidad	262
18.3.2.7.	Efecto Matriz	263
18.3.2.8.	Análisis de muestras reales	268
18.3.3.	Conclusiones parciales de este trabajo	269
18.4.	Validación de método de análisis de pesticidas en arroz paddy mediante LC-QqQ/MS	270
18.4.1.	Selección de los pesticidas	270
18.4.2.	Validación de la metodología en arroz paddy	270
18.4.2.1.	Selección de la cantidad de muestra	270
18.4.2.2.	Estudio de Recuperación	271
18.4.2.2.1.	Métodos de extracción y clean-up	271
18.4.2.3.	Repetitividad y Reproducibilidad	275
18.4.2.4.	LOD y LOQ	275
18.4.2.5.	Linealidad	275
18.4.2.6.	Efecto Matriz	275
18.4.2.7.	Análisis de muestras reales	277
18.4.3.	Conclusiones parciales de este trabajo	277
	Residualidad de pesticidas en el procesamiento del arroz	
19.	Distribución de residuos de pesticidas aplicados en condiciones controladas en campo, en diferentes productos obtenidos durante el procesamiento de arroz	280
19.1.	Selección de los pesticidas	281
19.2.	Optimización de las condiciones a utilizar en LC-MS/MS y GC-MS	284
19.3.	Validación de la metodología	285
19.3.1.	Selección de la matriz a validar	285

19.3.2.	<i>Método de extracción y clean-up</i>	286
19.3.3.	<i>Estudio de Recuperación</i>	289
19.3.4.	<i>Repetitividad y Reproducibilidad</i>	291
19.3.5.	<i>LOD y LOQ</i>	291
19.3.6.	<i>Linealidad</i>	291
19.3.7.	<i>Efecto Matriz</i>	294
19.4.	<i>Extractabilidad de los pesticidas</i>	297
19.5.	<i>Distribución de los Pesticidas</i>	297
19.6.	<i>Conclusiones parciales de este trabajo</i>	302
	Procesos de oxidación avanzada	
20.	Degradación del quinclorac mediante fotólisis directa y fotocátalisis en diferentes sistemas acuosos	304
20.1.	<i>Experimentos de degradación</i>	306
20.1.1.	<i>Fotólisis directa de quinclorac</i>	306
20.1.2.	<i>Fotocátalisis del quinclorac</i>	308
20.2.	<i>Identificación de los Productos de Transformación de Quinclorac</i>	310
20.3.	<i>Ruta de degradación del quinclorac y evolución de los intermediarios de reacción</i>	320
20.3.1.	<i>Fotólisis</i>	320
20.3.2.	<i>Fotocátalisis</i>	321
20.4.	<i>Conclusiones parciales de este trabajo</i>	325
21.	Conclusión General	326
22.	<i>Bibliografía</i>	330

Índice de Figuras

Figura 1	Evolución de la producción de arroz paddy en la última década.	6
Figura 2	Gráfico del porcentaje de producción de arroz en zafra 2011/2012.	7
Figura 3	Principales países exportadores de arroz en el 2010/2011.	8
Figura 4	Principales regiones arroceras del Uruguay.	10
Figura 5	Ciclo de rotación del cultivo de arroz en Uruguay.	11
Figura 6	Clasificación toxicológica según la OMS.	23
Figura 7	Posibles mecanismos de transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente	26
Figura 8	Diagrama textural de suelo.	29
Figura 9	Morfología y Taxonomía de la planta de arroz. a. raíz, b. tallo, c. hoja, d-e. flor, f. grano.	40
Figura 10	Principales productos que se obtienen durante el procesamiento del arroz.	42
Figura 11	Esquema de analizador de Tipo Cuadropolo Simple.	90
Figura 12	Esquema de analizador de Trampa de Iones.	92
Figura 13	a. Esquema del proceso de formación de iones en ESI. b. Esquema del proceso de formación de iones mediante APCI.	95
Figura 14	Esquema de un espectrómetro de masas con analizador de Triple Cuadropolo.	96
Figura 15	a. Principio del análisis del analizador de Tiempo de Vuelo. b. Representación esquemática del analizador.	99
Figura 16	Principales partes del sistema QTRAP LC-MS/MS.	101
Figura 17	Representación esquemática del proceso de fotocatalisis heterogénea en una partícula de TiO ₂ .	115
Figura 18	Equipo de HPLC-DAD utilizado en el análisis de herbicidas de post-emergencia.	123
Figura 19	Equipo de LC-QqQ/MS utilizado en el análisis de pesticidas.	124
Figura 20	Equipo de LC-TOF/MS utilizado para el análisis de co-extractivos.	125
Figura 21	Equipo de LC-QLIT/MS utilizado para el análisis de pesticidas.	125
Figura 22	Equipo de LC-QTOF/MS utilizado para el monitoreo de quinclorac y sus productos de transformación.	126
Figura 23	Equipo de GC-MS utilizado para el análisis de pesticidas.	127
Figura 24	Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de herbicidas de post-emergencia mediante LC-DAD.	130
Figura 25	Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI positivo.	133
Figura 26	Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI negativo.	133
Figura 27	Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-TOF/MS en modo ESI positivo.	139
Figura 28	Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QLIT/MS en modo ESI positivo.	140
Figura 29	Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QLIT/MS en modo ESI negativo.	141
Figura 30	Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de quinclorac y sus productos de degradación mediante LC-QTOF/MS.	146
Figura 31	Mapa del Uruguay con los principales puntos de muestreo.	152
Figura 32	Mapa de España y la región de la Albufera con los puntos de muestreo.	153
Figura 33	Fotografías de diferentes puntos de muestreo en Uruguay.	154

Figura 34	Fotografías de diferentes puntos de muestreo en España.	154
Figura 35	Diagrama de flujo de los diferentes métodos testeados para el análisis de herbicidas en arroz mediante LC-DAD.	175
Figura 36	Diagrama de flujo de los diferentes métodos testeados para el análisis de pesticidas en arroz blanco mediante LC-QqQ/MS.	180
Figura 37	Diagrama de flujo de los diferentes métodos testeados para el análisis de pesticidas en arroz paddy mediante LC-QqQ/MS.	183
Figura 38	Precipitaciones promedio (mm) ocurridas durante el cultivo del arroz.	188
Figura 39	Suntest para el tratamiento de quinclorac, a -equipo, b -solución de QNC en agua, en agitación, c -comienzo del ciclo de irradiación.	193
Figura 40	Cromatograma de un extracto de suelo franco a 0,5 mg/kg obtenido con el método 4.	200
Figura 41	Comparación de los % de Rec. obtenidos con los diferentes métodos de extracción para alguno de los herbicidas en estudio, en suelos de diferente textura.	205
Figura 42	Cromatograma y espectro UV de una muestra real de suelo en donde se detectó clomazone a 56 µg/kg.	206
Figura 43	Cromatograma de un extracto de agua a 0,5 µg/L obtenido mediante SPE con cartuchos de C-18.	211
Figura 44	a. Concentración promedio en µg/L de los herbicidas detectados en aguas de cultivos de arroz. b. Muestra real de agua en la que se detectó clomazone.	216
Figura 45	Cromatograma de iones totales del mix de pesticidas a 0,5 µg/L incluidos en la Tabla 33, obtenidos mediante el método B del Experimental.	221
Figura 46	Porcentaje de pesticidas que presentaron efecto matriz medio, alto o nulo.	229
Figura 47	Cromatograma de iones totales de todos los pesticidas analizados en agua de cultivo de arroz a 10 µg/L.	233
Figura 48	Cromatograma en modo IDA para el análisis de quinclorac en agua de arroz.	234
Figura 49	Comparación de los LOD obtenidos en agua de cultivos de arroz, mediante el modo Scheduled y el Estándar.	236
Figura 50	a. Cromatograma de iones totales y los cromatogramas de iones extraídos del carbendazím en modo Estándar y b. en modo Scheduled.	237
Figura 51	Efecto matriz expresado en % de pesticidas.	243
Figura 52	a. Criterios utilizados para la identificación y confirmación del triciclazol en agua de cultivo de arroz. b. comparación con su estándar en matriz.	244
Figura 53	Concentración promedio de los pesticidas detectados en muestras de aguas de cultivos de arroz de Uruguay y España.	246
Figura 54	Cromatograma de un extracto de arroz a 0,25 mg/kg obtenido mediante LC-DAD.	250
Figura 55	Cromatograma de iones totales de un extracto de arroz blanco a 100 µg/kg obtenido con el método de QuEChERS original y analizado mediante el método B del Experimental.	255
Figura 56	% Rec. promedio obtenido para cada una de las masas de muestra testeadas (5; 7,5 y 10 g) con los 4 métodos de extracción y clean-up evaluados.	256
Figura 57	Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatograma de iones totales a 300 µg/kg obtenido usando el método A4, con los 3 tamaños de muestra evaluados.	266
Figura 58	Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatograma de iones totales a 300 µg/kg obtenido a partir de 7,5 g de muestra con los 4 métodos evaluados.	267
Figura 59	Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatograma de iones totales a 300 µg/kg obtenido a partir de 7,5g de muestra con el método A2.	268
Figura 60	Concentración promedio de los pesticidas detectados en muestras de arroz blanco.	269

Figura 61	Cromatograma de iones totales a 100 µg/kg en extracto de arroz paddy obtenido con el método A1 y el método B del Experimental.	270
Figura 62	Comparación del efecto matriz, en arroz paddy de los métodos evaluados, expresado en número de pesticidas.	276
Figura 63	Estudios de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatogramas de iones totales obtenidos para 5 g de arroz paddy mediante el método A1 y A2.	277
Figura 64	Efecto matriz de los pesticidas estudiados obtenidos con QuEChERS citrato y QuEChERS original en arroz paddy.	295
Figura 65	Efecto matriz de los pesticidas estudiados obtenidos con QuEChERS citrato y QuEChERS original en arroz blanco.	295
Figura 66	Cromatogramas en full scan de extractos de arroz blanco y paddy obtenidos con QuEChERS original mediante GC-MS y LC-TOF/MS.	296
Figura 67	Comparación de las concentraciones obtenidas para los 2 métodos seleccionados en las diferentes commodities estudiadas.	297
Figura 68	Ejemplos de la distribución de los residuos de pesticidas observada en las diferentes matrices analizadas.	301
Figura 69	Espectro UV de una solución de quinclorac en agua a 5mg/L y su superposición con el espectro solar.	305
Figura 70	a. Evolución del quinclorac en condiciones de fotólisis directa para 2 sistemas acuosos; agua de cultivos de arroz y agua ultra pura en diferentes condiciones de intensidad. b. Evolución del quinclorac en condiciones de fotocátalisis con TiO ₂ para 2 sistemas acuosos; a 250 w/m ² .	307-308
Figura 71	Elucidación estructural mediante masa exacta del P1.	312
Figura 72	Ruta de degradación del QNC durante la fotocátalisis en agua ultra pura.	312
Figura 73	a. Espectro de masa exacta del QNC y b. su patrón de fragmentación obtenido mediante LC-QTOF-MS/MS.	313
Figura 74	Fragmentación característica de los PTs isobáricos (m/z 258); P2, P3, P4 y P8 en experimentos de a. MS y b. MS/MS.	315
Figura 75	Cromatograma de iones extraídos del QNC y algunos de los PT obtenidos: P1-P4, P7-P9 y P12.	317
Figura 76	Elucidación estructural del PT P9 mediante masa exacta.	317
Figura 77	Elucidación estructural del PT P10 mediante masa exacta.	317
Figura 78	Elucidación estructural del PT P11 mediante masa exacta.	318
Figura 79	Elucidación estructural del PT P12 mediante masa exacta.	318
Figura 80	Elucidación estructural del PT P13 mediante masa exacta.	319
Figura 81	Elucidación estructural del PT P14 mediante masa exacta.	319
Figura 82	Evolución de los PT obtenidos mediante fotólisis. a. agua ultra pura y b. agua de cultivos de arroz.	321
Figura 83	Evolución de los principales intermediarios detectados durante el proceso foto catalítico en agua de cultivos de arroz.	322
Figura 84	Evolución de los principales intermediarios detectados durante el proceso foto catalítico en agua ultra pura.	323

Índice de Tablas

Tabla 1	Producción de los 12 principales países productores.	6
Tabla 2	Principales países exportadores de arroz en el 2010/2011.	8
Tabla 3	Estructura y ejemplos de las principales familias de pesticidas.	19
Tabla 4	Ejemplos de pesticidas según la familia química y modo de acción.	21
Tabla 5	Clasificación de los pesticidas según su persistencia.	22
Tabla 6	Clasificación de los pesticidas según la Organización Mundial de la Salud.	23

Tabla 7	Lista de sustancias prioritarias en agua, Decisión 2455/2001/CE.	34
Tabla 8	Valores Máximos Permitidos, Norma UNIT 833:2008.	36
Tabla 9	Composición química de los diferentes productos obtenidos durante el procesamiento del arroz.	43
Tabla 10	Métodos de siembra según el tipo de cultivo del arroz y su correspondiente altura máxima del agua del cultivo de arroz.	46
Tabla 11	Malezas más comunes encontradas en cultivos de arroz en zonas tropicales.	48
Tabla 12	Principales plagas en Uruguay con los correspondientes daños producidos.	54
Tabla 13	Ejemplos de pesticidas utilizados en cultivos de arroz en EE.UU., Asia, España, Uruguay, Australia, Italia y Brasil con las correspondientes tasas de aplicación.	58
Tabla 14	Factores de Procesamiento promedios, reportados en arroz.	60
Tabla 15	Comparación de LMRs en arroz establecidos por el <i>Codex Alimentarius</i> , Brasil, EE.UU., Taiwán, Corea y la UE.	62
Tabla 16	Niveles de residuos de pesticidas detectados en arroz, en el periodo 2000-2010.	64
Tabla 17	Diferentes ejemplos de métodos cromatográficos para análisis de pesticidas en matrices del ecosistema del arroz.	102
Tabla 18	Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de MS.	111
Tabla 19	Tolerancias máximas aceptadas para las intensidades relativas de los iones según la técnica espectrométrica.	111
Tabla 20	Longitudes de onda utilizadas, espectros de absorción, y tiempos de retención obtenidos durante el análisis de herbicidas de post-emergencia mediante HPLC-DAD.	131
Tabla 21	Modo de acción y parámetros operacionales optimizados para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI positivo y negativo.	135
Tabla 22	Modo de acción y parámetros operacionales optimizados para el análisis de residuos de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI positivo y negativo.	138
Tabla 23	Modo de acción y parámetros optimizados para el análisis de pesticidas mediante LC-QLIT/MS en modo positivo y negativo.	145
Tabla 24	Tiempo de retención e iones utilizados para la determinación de pesticidas mediante GC-MS.	148
Tabla 25	Planificación de los diferentes puntos de muestreo de agua en Uruguay.	149
Tabla 26	Esquema de tratamiento del cultivo de arroz en campo	187
Tabla 27	Características de los diferentes tipos de suelos evaluados.	201
Tabla 28	% Rec. y % RSD de los diferentes métodos estudiados a 0,5 mg/kg.	202
Tabla 29	Límites de detección, cuantificación y linealidad de los diferentes herbicidas obtenidos con el método 4.	204
Tabla 30	Comparación de la performance de 2 cartuchos de SPE para la determinación de los herbicidas de post-emergencia para 0,1; 0,3 y 0,5 µg/L en agua potable.	212
Tabla 31	Comparación de la performance de 2 cartuchos de SPE para la determinación de los herbicidas de post-emergencia a 1 y 5 µg/L en agua de cultivos de arroz.	213
Tabla 32	Límites de detección, cuantificación y linealidad de los diferentes herbicidas en ambas matrices obtenidos mediante SPE con cartuchos HLB OASIS® y C-18.	215
Tabla 33	% Rec. y % RSD obtenidos con el método desarrollado a los diferentes niveles de fortificación evaluados.	221
Tabla 34	LOD, coeficiente de correlación (r^2) y relación SRM2/SRM1 del método desarrollado mediante LC-QqQ/MS.	225
Tabla 35	Número de puntos por pico obtenidos en un extracto de agua de cultivo	238

	de arroz a 0,5 µ/L en modo Estándar y Scheduled.	
Tabla 36	Parámetros de validación: LOD, LOQ, coeficiente de correlación (r^2), reproducibilidad, repetitividad y pendiente matriz/solvente obtenidos con el método desarrollado en modo Scheduled.	240
Tabla 37	Condiciones experimentales optimizadas para los diferentes métodos estudiados.	251
Tabla 38	Comparación de los % Rec. y % RSD para 3 de los métodos testeados.	252
Tabla 39	% de Rec. y % RSD para el método QuEChERS modificado.	253
Tabla 40	Límites de detección, cuantificación y linealidad de los diferentes herbicidas obtenidos durante la validación del método QuEChERS modificado.	254
Tabla 41	Condiciones experimentales para los 4 métodos estudiados.	257
Tabla 42	% Rec. y % RSD obtenidos mediante LC-QqQ/MS para todos los pesticidas seleccionados en arroz blanco para los 4 métodos estudiados a 10 y 300 µg/kg usando 7,5 g de muestra.	261
Tabla 43	Efecto matriz de los pesticidas para los 4 métodos estudiados utilizando 7,5 g de arroz blanco.	263
Tabla 44	% Rec. y % RSD obtenidos mediante LC-QqQ/MS para todos los pesticidas seleccionados en arroz paddy con los 3 métodos estudiados a 20 y 200 µg/kg.	273
Tabla 45	Estructuras químicas, LMRs y estatus en la legislación Europea y en EE.UU. de los pesticidas seleccionados para el experimento.	282
Tabla 46	Técnica instrumental seleccionada para la determinación de cada uno de los pesticidas aplicados en campo.	285
Tabla 47	% Rec. y % RSD obtenidos mediante QuEChERS citrato y original en arroz blanco y arroz paddy mediante LC-QqQ/MS a los diferentes niveles de fortificación estudiados; 20 y 200 µg/kg.	287
Tabla 48	% Rec. y % RSD obtenidos para arroz blanco mediante QuEChERS acetato con y sin clean-up y para arroz paddy mediante QuEChERS acetato con clean-up mediante LC-QqQ/MS a los diferentes niveles de fortificación estudiados; 20 y 200 µg/kg.	288
Tabla 49	% Rec. y % RSD obtenidos mediante QuEChERS citrato y original en arroz blanco y arroz paddy mediante GC-MS a los diferentes niveles de fortificación estudiados; 20 y 200 µg/kg.	290
Tabla 50	Linealidad de los pesticidas estudiados en ambas matrices con los métodos validados mediante LC-QqQ/MS.	292
Tabla 51	Linealidad de los pesticidas estudiados en ambas matrices con los métodos validados mediante GC-MS.	293
Tabla 52	Distribución de los residuos de pesticidas detectados en las diferentes commodities evaluadas con sus correspondientes % RSD y K_{ow} .	298
Tabla 53	Composición elemental, masa exacta y tiempo de retención del QNC y sus PTs obtenidos durante los procesos de fotocátalisis y fotólisis y mediante LC-QTOF-MS/MS.	310

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1	Cálculo del tiempo que tardan los iones en llegar al detector	99
Ecuación 2	Cálculo del efecto matriz.	110

Índice de Esquemas

Esquema 1	Reacciones que ocurren en el proceso de fotocátalisis heterogénea.	115
Esquema 2	Reacciones que ocurren en el proceso de fotocátalisis homogénea.	117

Lista de Abreviaturas y Acrónimos

ACA - Asociación de Cultivadores de Arroz de Uruguay
AMPA - Acido amino-metil-fosfónico
AOAC - International Association of Official Analytical Chemists
APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) - Ionización Química a Presión Atmosférica
APPI - Fotoionización a Presión Atmosférica
Bt – *Bacillus thuringiensis*
BPA - Buenas Prácticas de Agricultura
CE – (Collision Energy) – Energía de Colisión
CI (Chemical Ionization) - Ionización Química
CID (Collision Induced Dissociation) - Disociación por Colisión Inducida
CL₅₀ - Concentración Letal Media
CL↓OM - Suelo Franco Arcilloso con Bajo Contenido en Materia Orgánica
CL↑OM - Suelo Franco Arcilloso con Alto Contenido en Materia Orgánica
C↑OM - Suelo Arcilloso con Alto Contenido en Materia Orgánica
Co.Sa.Ve - Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur
COD - Carbono Orgánico Disuelto
COT - Carbono Orgánico Total
CWA - Ley de Agua Limpia
DBE - Double Bond Equivalent
DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano
DG SANCO - Dirección General de Sanidad y Protección del Consumidor
DLLME – Micro extracción Dispersiva Líquido-Líquido
DL₅₀ - Dosis Letal Media
DP – Declustering Potential
dSPE - Extracción Dispersiva en Fase Sólida
ECD (Electron Capture Detector) – Detector de Captura Electrónica
EI (Electron Ionization) – Ionización por Impacto Electrónico
EM – Efecto Matriz
EP – Entrance Potential
EPA (Environmental Protection Agency) – Agencia de Protección Ambiental
EPI – Ion Enhance Product
ESI- Ionización por Electrospray
ESL - Extracción Sólido-Líquido

Abreviaturas y Acrónimos

FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA - Food and Drug Administration
fF - foto-Fenton
FH - Fotocatálisis Heterogénea
FIA – Flow Injection Analysis
FID - Flame Ionization Detector- Detector de Ionización de Llama
FM - Fase Móvil
FPD (Flame Photometric Detector) – Detector Fotométrico de Llama
GC – Cromatografía Gaseosa
GCB (Graphitized Carbon Black) - Carbón Grafitizado
GC-MS – Cromatografía Gaseosa Acoplada a Espectrometría de Masas
GPC (Gel Permeation Chromatography) – Cromatografía de Gel Permeación
HPLC (High Resolution Liquid Chromatography) - Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IDA - Information-Dependent-Acquisition
IDA - Ingesta Diaria Admitida
IRRI - Instituto Internacional de Investigación de Arroz ISO - International Standardization Organisation
IUPAC - Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LC-DAD – Cromatografía Líquida con Detector de Arreglo de Diodos
INASE - Instituto Nacional de Semillas
INIA – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
JMPR - Junta de la FAO/WHO encargada de residuos de pesticidas
 K_{ow} – Constante de reparto octanol-agua
 K_{oc} - Constante de partición
LC – Cromatografía Líquida
LC-MS/MS – Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas
LC-QLIT/MS - Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas con Analizador híbrido de Triple Cuadrupolo y Trampa de Iones Lineal
LC-QqQ/MS - Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas con Analizador de Triple Cuadrupolo
LC-TOF/MS – Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas con Analizador de Tiempo de Vuelo
LLE (Liquid Liquid extraction) - Extracción Líquido-Líquido
LMR – Límite Máximo de Residuo
LOD (Limit of Detection) - Límite de Detección

Abreviaturas y Acrónimos

LOQ (Limit of Quantification) – Límite de Cuantificación

L↓OM - Suelo Franco de Bajo Contenido en Materia Orgánica

MASE - Extracción con Solvente Asistida con Membrana

MCL - Niveles Máximos de Contaminantes

MO – Materia Orgánica

MRM - Método Multi-residuo

MRM - Multiple Reaction Monitoring

MS (Mass Spectrometry) - Espectrometría de Masas

MSP - Ministerio de Salud Pública

MVOTMA - Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

NCI (Negative Chemical Ionization) - Ionización Química Negativa

NPD (Nitrogen Phosphorous Detector) – Detector de Nitrógeno y Fósforo

NT - Nitrógeno Total

OMS - Organización Mundial de la Salud

PAO - Procesos Avanzados de Oxidación

PCI (Positive Chemical Ionization) - Ionización Química Positiva

PISQ - Programa Internacional de Seguridad Química

PLE – Extracción con Fluido Presurizado

PSA - Amina Primaria y Secundaria

PTFE - Politetrafluoroetileno

PTs - Productos de Transformación

PTV (Programmable Temperature Vaporization) - Vaporización por Temperatura Programable

% Rec – Porcentaje de Recuperación

QNC - Quinclorac

QQQ (Triple Quadrupole) – Triple Cuadrupolo

QTOF (Quadrupole-time of flight) - Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo

QuEChERS – (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) – Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro

RSD – (Relative Standard Deviation) - Desviación Estándar Relativa

SIM (Selected Ion Monitoring) – Monitoreo de Iones Seleccionados

S/N - Signal to Noise ratio – Relación señal-ruído

SPE (Solid Phase Extraction) – Extracción en Fase Sólida

SPME (Solid Phase Microextraction) – Micro-Extracción en Fase Sólida)

SRM – Selected Reaction Monitoring

TIC (Total Ion Chromatogram) – Cromatograma de Iones Totales

Abreviaturas y Acrónimos

TOC (Total Organic Carbon) - Carbono Orgánico Total

TOF (Time of Flight) – Tiempo de Vuelo

TPP – Trifenil fosfato

UE – Unión Europea

UNIT – Instituto Uruguayo de Normas Técnicas

USDA (U.S. Department of Agriculture) – Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UV - Ultravioleta

XIC (Extracted Ion Chromatogram) – Cromatograma de Iones Extraídos

1. Resumen

Uruguay es el 6to país exportador mundial de arroz y a pesar de que el sistema de cultivo del arroz aplicado es considerado sustentable, la creciente demanda tuvo como consecuencia la intensificación de los cultivos. Generalmente la aplicación de un herbicida en un cultivo de arroz es seguida por la inundación del cultivo y, dependiendo de las prácticas agrícolas, se aplican también fungicidas e insecticidas.

En función del manejo del agua realizado, de las condiciones ambientales y de las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas, éstos pueden persistir hasta su degradación en el área donde fueron aplicados o ser transportados fuera del área de cultivo, contaminando otros recursos naturales. Por todos estos motivos se debe tener extrema precaución en el uso de fitosanitarios y conocer el nivel en el que se encuentran ya que por su acumulación o residualidad pueden suponer un riesgo no solo para el consumidor, sino también para el ambiente.

Con el fin de generar información para un futuro estudio del impacto ambiental que pueden producir dichos agroquímicos en el ecosistema del arroz, se desarrollaron diversas técnicas analíticas multi-residuos para la determinación de residuos de pesticidas mediante LC-DAD, LC-QqQ/MS, LC-QLIT/MS y GC-MS en diversas matrices representativas: suelo, agua, arroz paddy y arroz blanco.

Para cada determinación se optimizaron las condiciones de extracción y clean-up y las condiciones instrumentales para el análisis de los compuestos de interés.

Se desarrollaron y validaron metodologías de análisis multi-residuo para la determinación de 9 herbicidas de post-emergencia en suelo, agua y grano de arroz utilizando diferentes condiciones de extracción y clean-up y el mismo método cromatográfico mediante LC-DAD.

Las principales metodologías de extracción evaluadas fueron extracción con solvente en suelos mediante la agitación con shaker orbital, extracción en fase sólida para el análisis de agua y metodologías basadas en el método de QuEChERS para grano de arroz.

La metodología desarrollada para el análisis de herbicidas en agua mediante LC-DAD fue posteriormente ajustada para el análisis de 40 pesticidas mediante LC-QqQ/MS.

Además se validó una metodología para el análisis de 70 pesticidas mediante la técnica de “dilute and shoot” que consiste en la introducción de la muestra directamente en la columna cromatográfica sin un paso previo de pre-concentración y clean-up. Esta metodología se desarrolló en un sistema LC-QLIT/MS.

Para arroz blanco, la metodología validada mediante LC-DAD sirvió como insumo para el posterior desarrollo de otras metodologías de análisis multi-residuo en arroz blanco y en arroz paddy en las cuales se optimizaron diferentes condiciones de extracción y clean-up con el fin de seleccionar el mejor método de análisis.

En general, los resultados de las determinaciones realizadas cumplen con los requisitos de las guías europeas de validación y control de calidad para residuos de pesticidas en alimentos, documento N° SANCO/12495/2011.

Las metodologías validadas fueron aplicadas para la evaluación de la distribución de residuos de pesticidas en los distintos productos generados durante el procesamiento del arroz.

La constatación de la presencia de pesticidas en el ecosistema del arroz, dirigió las etapas finales del trabajo de tesis a la exploración de posibles soluciones ambientalmente amigables para disminuir el impacto de los agroquímicos en la sustentabilidad del sistema. En ese contexto, se realizó la evaluación de 2 procesos de oxidación avanzada, fotólisis y fotocátalisis con TiO_2 tomando el herbicida quinclorac como modelo, por ser un herbicida semi-persistente, y uno de los más aplicados en nuestro país, frecuentemente encontrado en sistemas acuáticos y del que no se conocen datos de su remediación química. La evolución de los productos de degradación de este herbicida se siguió con la técnica de LC-QTOF-MS/MS, identificándose 14 nuevos productos de transformación. Estos resultados sirven como herramientas para la realización periódica del monitoreo del ecosistema de arroz. El esquema de trabajo utilizado puede servir como disparador para futuras evaluaciones de los diferentes sistemas agrícolas en crecimiento en nuestro país.

Introducción

2. Generalidades

En las últimas décadas ha habido un marcado crecimiento en la producción agrícola, 145% aproximadamente. Concomitantemente, durante el mismo período la población mundial se ha duplicado, con el consiguiente aumento en la demanda de alimentos. En el mismo sentido, el área total destinada a la agricultura se ha expandido alrededor de un 11%, desde 4,5 a 5 billones de ha lo que ha traído aparejado un consumo de casi 4 veces más de fertilizantes, así como un aumento drástico en el uso de pesticidas en la agricultura, constituyendo aproximadamente 2,6 billones de kg por año, de los cuales un 49% corresponde a herbicidas, 25% insecticidas, 22% fungicidas y un 3% a otras clases. Todos los factores descriptos anteriormente tienen un impacto directo positivo en la producción de alimentos a nivel mundial pero impactan negativamente en la salud de los consumidores y el medio ambiente.⁽¹⁾ A medida que la población aumenta, el uso de insumos como el agua, los fertilizantes, los pesticidas y la mano de obra es cada vez mayor con el fin de incrementar la producción. Esto provoca una disminución en la calidad del suelo pudiendo también favorecer la contaminación de los recursos naturales, agua, suelo, y la biota.⁽²⁾ Esto ha generado gran preocupación acerca del deterioro de los recursos naturales ocasionado por estas prácticas agrícolas.

La preocupación por mantener la viabilidad de los agro-ecosistemas tiene larga data. Ya en la década del 80 surge el concepto de agricultura sustentable. La agricultura sustentable promueve la estabilidad desde el punto de vista ambiental, económico y ecológico centrándose en el desarrollo de prácticas y tecnologías agrícolas que: no generen efectos adversos en el ambiente, que sean accesibles y efectivas para los agricultores, que produzcan aumentos en la producción de alimentos y brinden beneficios al medio ambiente.⁽³⁾

Particularmente en los cultivos de arroz es importante el logro de una agricultura sustentable. Por ejemplo en Asia, el agua y los nutrientes del suelo requeridos para un buen funcionamiento del agro-sistema o ecosistema del arroz están escaseando, con la consiguiente disminución en la tasa de producción. La intensificación de este cultivo y el uso excesivo de pesticidas

como en la mayoría de los sistemas agrícolas, están perjudicando al ambiente y al ser humano.

El cultivo del arroz es uno de los más importantes a nivel mundial considerando el área de cultivo y el número de personas que dependen de él. Globalmente ocupa una superficie de aproximadamente 145 millones de ha, cerca de una décima parte de la tierra arable, mientras que en los países asiáticos ocupa la tercera parte del área cultivada.⁽⁴⁾

El consumo mundial de arroz ha aumentado un 40% en los últimos 30 años y en el 2010/2011 se estima aumente un 2% hasta aproximadamente 460 millones de toneladas, de los cuales 389 millones de toneladas se destinarán al consumo humano.

El consumo per cápita de arroz blanco a nivel mundial aumentó desde 61,5 kg hasta aproximadamente 85,9 kg. Existen básicamente 3 modelos de consumo; el asiático en donde el consumo promedio es mayor a 80 kg /persona (China 90 kg, Indonesia 150 kg), el de los países en vías de desarrollo en el cual se consumen entre 30 a 60 kg /persona (Colombia: 40 kg, Brasil: 45 kg, Uruguay 11 kg) y el modelo del oeste en donde se consumen 10 kg /persona (Francia: 4 kg, Estados Unidos: 9 kg).⁽⁵⁾

Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el volumen anual de toneladas de arroz cáscara producido en el año 2010 fue aproximadamente 699 millones de toneladas, que generaron cerca de 460 millones de toneladas de arroz elaborado y se prevé que en el 2011 la producción aumente un 3% (**Figura 1**). En general, las principales variaciones que se observan en la producción año a año se deben principalmente a anomalías meteorológicas, especialmente en ciertos países de Asia oriental y meridional, donde se encuentra concentrada la producción (aproximadamente 90%).⁽⁶⁾

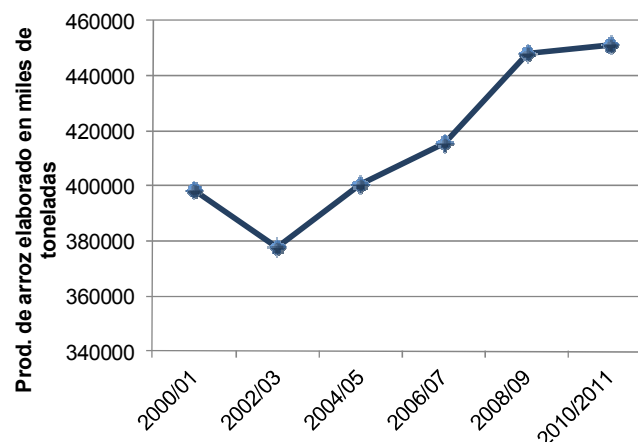


Figura 1. Evolución de la producción de arroz paddy en la última década.

Según la proyección mundial para la zafra 2010/11 realizada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Asia contribuye con un 88% de la producción a nivel mundial, siendo China e India los países que proporcionan más de la mitad del arroz mundial (52%). América Latina constituye el segundo continente en cuanto a producción (2,8%), siendo Brasil, Argentina, Uruguay y Perú, los países con mayor producción. En la **Tabla 1** se muestran los 12 países que presentaron mayor producción en la zafra 2011/2012, junto con los volúmenes de producción de arroz blanco y la **Figura 2** muestra un gráfico del porcentaje de contribución de cada uno de estos países.^(7,8)

País	Producción (millones de ton. arroz blanco)
China	141
India	100
Indonesia	37,3
Bangladesh	33
Vietnam	25,4
Tailandia	20,3
Filipinas	10,7
Burma	10,5
Brasil	8,9
Perú	8,4
Japón	7,9
Pakistan	6,6

Tabla 1. Producción (millones de ton. Arroz blanco) de los 12 principales países productores.⁽⁷⁾

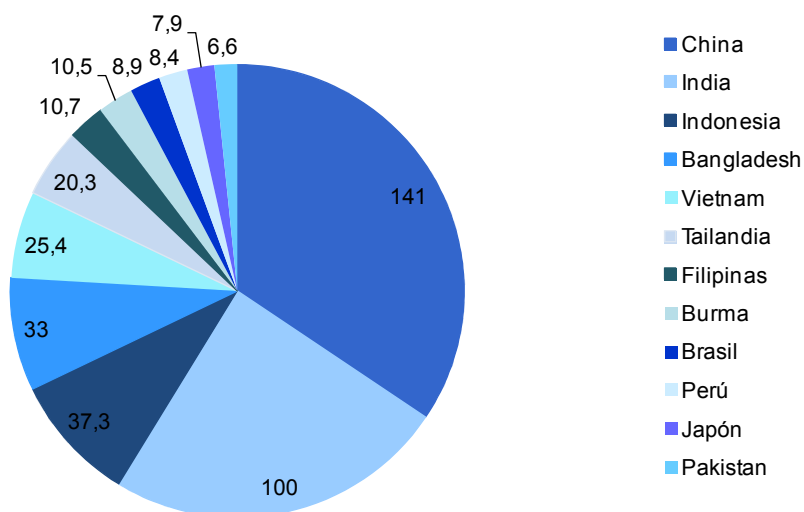


Figura 2. Gráfico del porcentaje de producción de arroz en zafra 2011/2012.

El pronóstico de la FAO indica que se ha aumentado en un 15% el comercio mundial de arroz en el 2011.⁽⁶⁾ El incremento se explica por las entregas mayores registradas en África pero también en América del Norte y Europa, que compensan la disminución de las importaciones en Asia, América Latina y el Caribe. Con respecto a las exportaciones se prevé que Tailandia, y en menor proporción Vietnam, Brasil, Camboya, China, India y Uruguay aumenten sus entregas en el período 2011-2012.⁽⁶⁾

Según la Asociación de Cultivadores de Arroz de Uruguay (ACA) las exportaciones/importaciones para la zafra 2010/11 están proyectadas en 30.280.000 toneladas de arroz elaborado. Los principales países exportadores en el 2010/2011 fueron: Tailandia, Vietnam, Pakistán, India, Camboya, Uruguay, China, Egipto, Argentina y Brasil (**Tabla 2** y **Figura 3**). Estos datos indican que nuestro país es actualmente el 6to país exportador de arroz.^(7,9)

País	Exportaciones (millones de ton. arroz blanco)
Tailandia	10
Vietnam	5,9
Pakistán	3,2
EE.UU.	2,7
India	2,8
Uruguay	1,1
Camboya	1
Argentina	0,8
Burma	0,8

Tabla 2. Principales países exportadores de arroz en el 2010/2011.

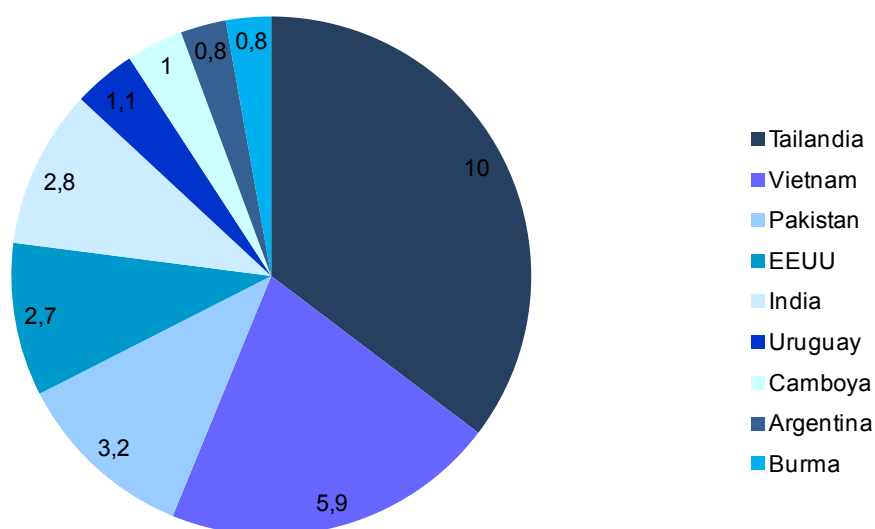


Figura 3. Principales países exportadores de arroz en el 2010/2011.

Para asegurar el abastecimiento de la demanda de arroz en los próximos años los países productores deberán hacer un gran esfuerzo a nivel nacional, regional e internacional en inversiones y políticas apropiadas que permitan lograr producciones sustentables.⁽¹⁰⁾ En este marco, en el mundo se está trabajando en la implementación de especificaciones técnicas de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), orientadas a los productores de forma de asegurar la inocuidad de los alimentos, buscando también proteger al mismo tiempo a los trabajadores del campo y al medio ambiente.^(11,12,13)

2.1. Producción de Arroz en Uruguay

La superficie de arroz en los últimos 20 años pasó de 83 mil hectáreas en la zafra 1989/90 a 162 mil en la 2009/10, lo que representa un crecimiento de aproximadamente el 100%. La producción, en el mismo período, pasó de 365 a 1.287.234 toneladas, siendo el aporte de las regiones norte y este el más significativo. La **Figura 4** muestra las principales zonas en donde se cultiva arroz en Uruguay. Estas zonas son: la zona norte (18,4%), principalmente en Artigas y Salto ocupando parte de la cuenca del Río Cuareim y Uruguay; la zona central (11,6%), abarca fundamentalmente la cuenca del Río Negro y comprende los departamentos de Rivera, Tacuarembó, oeste de Cerro Largo y norte de Durazno. El 70% restante de la producción está concentrado en la zona este, Rocha, Lavalleja, Treinta y Tres y este de Cerro Largo. Abarca las planicies de la Laguna Merín y el océano Atlántico.⁽¹⁴⁾ Uruguay posee una superficie potencialmente cultivable de más de un millón de hectáreas sin embargo la superficie sembrada en el 2009/2010 fue de 162.000 hectáreas. Esta es una característica única de nuestro país ya que en el mundo las áreas de arroz se cultivan todos los años, incluso en algunos países tropicales como Colombia, Tailandia o Vietnam se cultiva hasta 2 o 3 veces al año.

La variedad más sembrada en Uruguay es El Paso 144 (58,5% en la zafra 2009/10). Las dos variedades más utilizadas después de El Paso 144 son Olimar y Tacuarí, entre las tres variedades ocupan en general, el 90% de la superficie sembrada. Las principales características de las variedades utilizadas son:

El Paso 144: es una variedad tropical (índica) de alto rendimiento, aproximadamente 21%, de ciclo largo. Las plantas son bajas con hojas erectas y pilosas. Sus granos son largos de cáscara clara y pilosa. En la etapa reproductiva es susceptible al frío por lo que debe sembrarse temprano, hasta mediados de noviembre.

INIA Tacuarí: Las plantas son bajas y erectas y los granos poseen cáscara clara sin pilosidad. Posee alta tolerancia a bajas temperaturas en la etapa reproductiva.⁽¹⁵⁾

INIA Olimar: es una variedad tropical que supera el rendimiento y presenta menor susceptibilidad al desgrane comparado con las otras variedades disponibles. Su ciclo es más corto que el de la variedad el Paso 144. Las plantas poseen hojas erectas y pilosas. Sus granos son pesados y pilosos.⁽¹⁵⁾ Uruguay exporta aproximadamente el 90% de la producción, un 7% se destina a semilla y el resto se destina a consumo interno.⁽¹⁶⁾

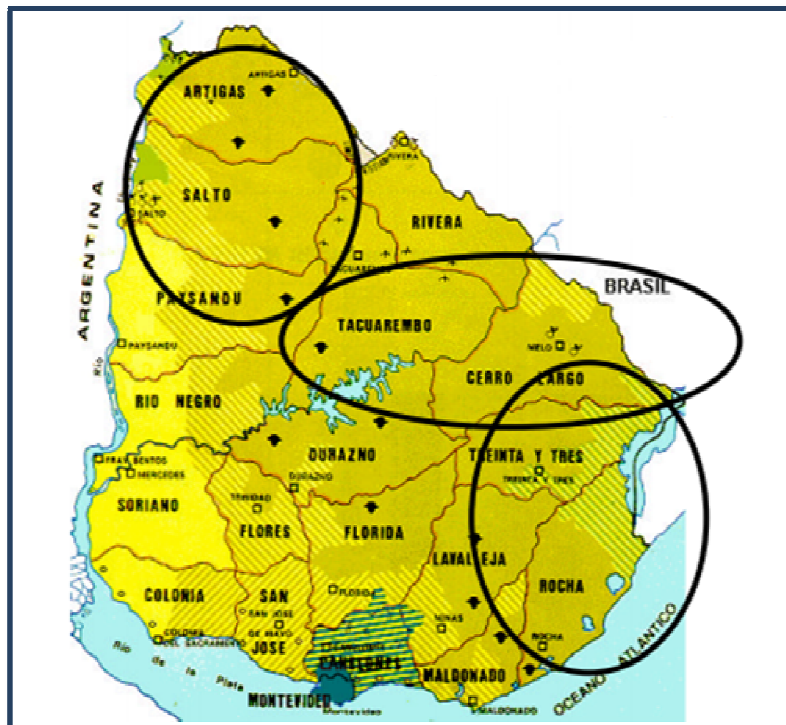


Figura 4. Principales regiones arroceras del Uruguay.

El cultivo de arroz en Uruguay se basa como se mencionó principalmente en un sistema de producción de baja intensidad, en rotaciones con pasturas e integrado con la producción ganadera. De forma que, como se muestra en la **Figura 5**, se cultiva arroz en los dos primeros años, luego durante 4 años se cultivan praderas y otros cultivos alternativos y finalmente en el séptimo año se vuelve a sembrar arroz para comenzar un nuevo ciclo.

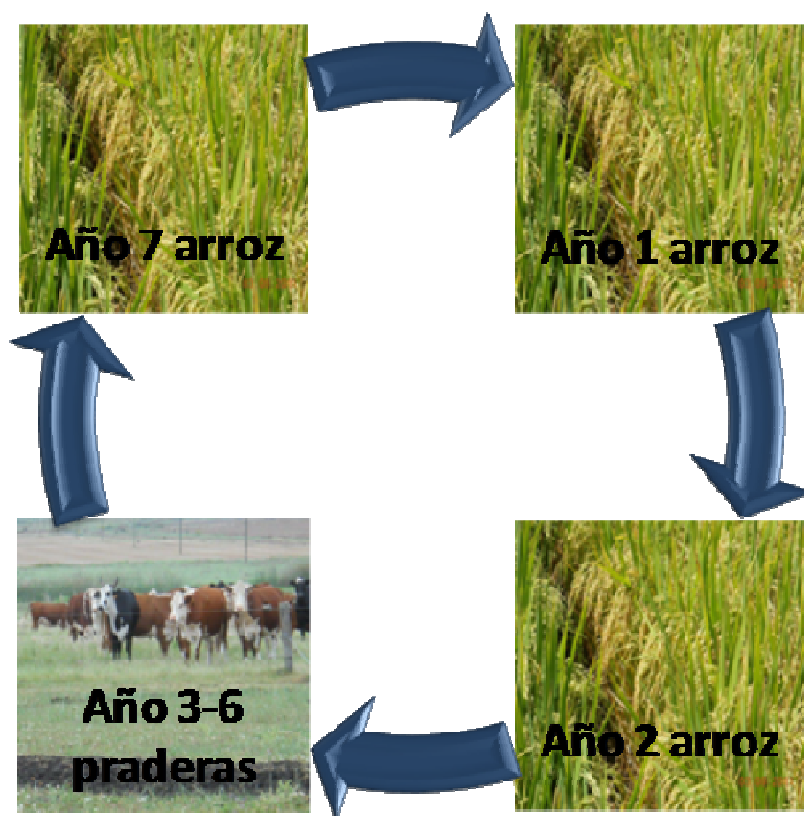


Figura 5. Ciclo de rotación del cultivo de arroz en Uruguay.

Estas características le confieren al sector arrocero la posibilidad de aprovechar estas ventajas comparativas y diferenciarse dentro de la región. En Uruguay, el 60% del cultivo se realiza sobre campo natural o diversos tipos de retorno y sólo el 40% se siembra sobre rastrojos de arroz del año anterior. Los retornos mencionados se efectúan sobre campos naturales, campos con varios años de descanso sin arroz o sobre praderas, rotando en un sistema de producción donde, como se comentó anteriormente, en la mayoría de los casos los campos pasan por lo menos cuatro a seis años sin ser cultivados y, en algunas circunstancias, más tiempo aún.⁽¹⁵⁾

Este sistema de producción, sumado a una alta calidad de semilla utilizada por los productores, le otorga al cultivo de arroz una alta sustentabilidad. Existe información que indica que el sistema de rotación cultivo-pastura con la integración de la producción ganadera, es el más sustentable ya que entre otros, mejora las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, disminuye

la presencia de malezas, insectos e inóculo de enfermedades, y disminuye la frecuencia de aplicación de los agroquímicos.⁽¹¹⁾ El sistema de producción de arroz que predomina en nuestro país, si bien no ha escapado a la tendencia creciente en el uso de fertilizantes y fitosanitarios, se diferencia de otras regiones productoras porque prácticamente no existe el monocultivo sino que se basa en general en un sistema de rotaciones con pasturas integrado con la actividad ganadera.^(16,17) Además posee otras características que hacen que se lo considere como un cultivo de baja intensidad e impacto ambiental.⁽¹¹⁾

Estas características son:

- Se siembra un sólo cultivo por año en seco y se inunda en forma definitiva entre los 30-40 días después de la emergencia, evitando posibles problemas ambientales por la inundación continua.
- En el 95% del área de siembra se utilizan variedades nacionales y en el 85% del área se utiliza semilla certificada, (semilla que se manipula de forma de mantener la identidad y la pureza genética específica) reduciendo el riesgo de aparición de arroz negro y rojo. La certificación de las semillas en Uruguay la realiza el Instituto Nacional de Semillas (INASE) y garantiza que se utilicen semillas que han cumplido un proceso para su producción y comercialización, en acuerdo con lo establecido en los estándares específicos, mediante el cual se puede conocer la pureza varietal y los otros aspectos relativos a la calidad de esas semillas.
- Los agroquímicos se utilizan con baja frecuencia y en menor cantidad en comparación con otros países productores de arroz, viabilizada por la rotación.^(11,18)

En los últimos años, la producción agrícola en nuestro país sigue la tendencia de crecimiento observada a nivel mundial, tanto en superficie como en rendimiento. Sin embargo, en el caso del arroz la producción de este cultivo sigue una tendencia al alza siendo, en la última década, un 22% superior pero con aproximadamente la misma área sembrada. En el período 2008-2012 la producción subió un 5,5% y en el último año un 1,1%.⁽¹⁹⁾ Este aumento en el rendimiento requiere un uso cada vez más intensivo de materiales de alto potencial de producción que requieren altas tecnologías para su uso. A modo de ejemplo, en la zafra 2006/2007, el 99,6% del área de arroz se produjo con uso de

fertilizantes, en el 89,9% del área se utilizaron herbicidas, el 64,3% de la superficie fue tratada con fungicidas y en el 7,8% de la superficie se aplicaron insecticidas.⁽¹⁸⁾

En el año 2005, según el Índice de Sustentabilidad Ambiental creado por las Universidades de Yale y Columbia de EE.UU., Uruguay ocupaba el tercer puesto como país menos contaminado del mundo.⁽²⁰⁾ A partir del 2005 este índice fue precedido por el EPI (Índice de Desempeño Ambiental). Para el cálculo del EPI, los investigadores modificaron la metodología utilizada en la estimación del índice ESI. Las variables consideradas se dividen en dos grandes objetivos: 1)- salud ambiental que incluye el impacto del ambiente en la salud, el agua potable y el saneamiento básico, y los efectos de la calidad del aire en la salud y 2)- la vitalidad de los ecosistemas enfocada principalmente en los efectos de la contaminación del aire en los ecosistemas, los recursos hídricos, la biodiversidad y el hábitat, los recursos naturales productivos y el cambio climático. El EPI del año 2012 ubica a nuestro país en el puesto 46 a nivel mundial y en el puesto 7 en América Latina.⁽²¹⁾ Este descenso en el ranking mundial hace que sea fundamental conocer el impacto ambiental de las nuevas tendencias en las prácticas agrícolas, con el fin de: orientar a los productores en el manejo del cultivo durante toda la cadena de producción e intentar mitigar los efectos nocivos de dichas prácticas para mejorar el estatus de nuestro país.

A nivel mundial el mercado consumidor es cada vez más exigente en cuanto a la inocuidad de los productos que adquiere exigiendo certificados de calidad de todos aquellos consumibles. Además Uruguay es el principal exportador de América Latina, exportando cerca del 90% de su producción.^(7,9) Por todo lo anteriormente expuesto es necesario desarrollar procedimientos que permitan conocer los efectos en el ambiente del manejo realizado en los cultivos y su incidencia directa en el producto final. Particularmente, parte de ese impacto se puede evaluar a través de la determinación de residuos de agroquímicos en el suelo y en cursos de agua que pueden afectar la biodiversidad de los agroecosistemas como el arrozero, así como evaluar la persistencia de estos contaminantes en el grano para evitar un daño en la salud de los consumidores.

3. Pesticidas

La producción y el consumo de productos vegetales y animales tienen un papel muy importante a nivel mundial. El rendimiento de la producción se ve afectado negativamente por organismos nocivos, por lo tanto es fundamental proteger los diferentes cultivos de dichas plagas con el fin de evitar una disminución del rendimiento de los cultivos o daños a la producción y así garantizar la cantidad y calidad de los productos cosechados y la productividad agrícola. Con este fin, existen diferentes métodos alternativos disponibles, tales como el uso de variedades resistentes, la rotación de cultivos ⁽²²⁾, la eliminación de malezas de forma mecánica, el control biológico ^(23,24) y el uso de productos fitosanitarios, también denominados, pesticidas, plaguicidas o agroquímicos, que es la práctica más común para la protección de los cultivos de las plagas o pestes. ⁽²⁴⁾

3.1. Definición de pesticida

El *Codex Alimentarius* define un pesticida como cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye a las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. La definición no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales. ⁽²⁵⁾

Por otro lado la Unión Europea (UE) define un producto fitosanitario como una sustancia activa o un preparado presentado en la forma en que se ofrecen para su distribución a los usuarios, destinados a:

- proteger los vegetales contra todos los organismos nocivos o evitar la acción de los mismos, siempre que dichas sustancias no se definan de otros más adelante;
- influir en el proceso vital de los vegetales de forma distinta de cómo lo hacen las sustancias nutritivas (por ejemplo, los reguladores de crecimiento);
- mejorar la conservación de los productos vegetales siempre y cuando dichas sustancias o productos no estén sujetos a disposiciones particulares sobre conservantes;
- destruir los vegetales inconvenientes;
- destruir partes de vegetales, o controlar o evitar un crecimiento inadecuado de los mismos.⁽²⁶⁾

Uruguay toma la definición del Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur (Co.Sa.Ve), el cual define un plaguicida como cualquier sustancia, agente biológico, mezcla de sustancias o de agentes biológicos, destinada a prevenir, controlar o destruir cualquier organismo nocivo, incluyendo las especies no deseadas de plantas, animales o microorganismos que causan perjuicio o interferencia negativa en la producción, elaboración o almacenamiento de los vegetales y sus productos. El término incluye coadyuvantes, fito-reguladores, desecantes y las sustancias aplicadas a los vegetales antes o después de la cosecha para protegerlos contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte.⁽²⁷⁾

De acuerdo con los datos del British Crop Protection Council, existen aproximadamente 908 sustancias activas que son comercializadas como pesticidas en diversos tipos de formulaciones. Estas sustancias están divididas en más de 100 clases, encontrándose las benzoilureas, triazoles, estrobilurinas, neonicotinoides, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretroides, sulfonilureas y triazinas, entre los grupos más importantes.^(28,29,30)

Las características físico-químicas de los pesticidas son considerablemente diferentes, pueden presentar carácter ácido, básico ó neutro, ser volátiles o no, poseer diferente polaridad, entre otros. Estos compuestos pueden contener en su estructura halógenos, fósforo, azufre y nitrógeno que permiten la detección selectiva de estos compuestos. Esta gran diversidad de propiedades fisicoquímicas causa serios problemas en el desarrollo de métodos analíticos

universales para la determinación de residuos, que deberían tener el alcance más amplio posible.⁽²⁹⁾

3.2. Historia de los pesticidas

El uso de insecticidas data de 4500 años atrás por los sumerios, que utilizaron compuestos de azufre para controlar insectos y ácaros. Escritos de la antigua Grecia y Roma demuestran que la religión, la magia popular y el uso de lo que puede denominarse métodos químicos fueron usados para el control de enfermedades en las plantas, de las malezas, insectos y plagas de animales. Como no había industria química, se empleaban productos de origen vegetal o animal, de fácil obtención o disposición. Se quemaban materiales, como la paja, peces, basura, buey o cuernos de animal para que el humo, preferentemente maloliente, se extendiera a lo largo de la huerta, cultivos y viñedos. La planta de tabaco fue utilizada para matar insectos desde 1690, años después se descubrió que el principio activo responsable del efecto insecticida era la nicotina.⁽³⁰⁾

Las malezas se controlaron principalmente de forma manual, pero diferentes "métodos químicos" como el uso de sal o de agua de mar también se describen en la antigüedad.^(30,31)

El piretro, derivado de las flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, se ha utilizado también como insecticida por más de 2000 años. El piretro es una mezcla de cuatro compuestos: las piretrinas I y II y las cinerinas I y II. Alrededor de 1950 con el fin de imitar los efectos del piretro se sintetizaron sustancias químicas, de estructura muy similar a las piretrinas que se llamaron piretroides. Estos compuestos sintéticos se dividen en 4 generaciones. La primera generación incluye un solo compuesto, la aletrina. La segunda generación se sintetizó en el período del 1965-1973. Algunos ejemplos son la tetrametrina, resmetrina y bioresmetrina. El fenvalerato y la permetrina son de la tercera generación. Estos compuestos poseen gran efecto insecticida y poseen mayor estabilidad a la luz. La cuarta generación (bifentrín, λ -cihalotrina, cipermetrina, deltametrina, entre otros) son fotoestables y poseen una baja volatilidad por lo que el efecto residual es más duradero (**Tabla 3**).^(30,32,33) En general son

insecticidas de contacto con un efecto de “knockdown” rápido que combinado con una toxicidad muy baja hacia mamíferos los hacen de elevada importancia.⁽³⁰⁾

Hasta la década de 1940 las sustancias inorgánicas, como el clorato de sodio y ácido sulfúrico, o los productos químicos orgánicos derivados de fuentes naturales fueron ampliamente utilizados en el control de plagas. Compuestos orgánicos, tales como el nitrofenol, clorofenol, la naftalina y aceites de petróleo se utilizaron contra las plagas de hongos e insectos, mientras que el sulfato de amonio y arseniato de sodio se utilizaron como herbicidas.⁽³¹⁾

Entre 1930 y 1940 como resultado de investigaciones enfocadas al desarrollo de armas químicas surgen los plaguicidas organoclorados que, originalmente fueron probados en insectos. Uno de los primeros compuestos, el diclorodifeniltricloroetano (DDT) fue sintetizado por Zeidler en 1874, y sus propiedades insecticidas fueron descritas por Paul Müller en 1939 (**Tabla 3**).⁽³¹⁾ El DDT se utilizó por primera vez durante la segunda Guerra Mundial para proteger a los soldados estadounidenses contra enfermedades transmitidas por vectores y se comercializó en los EE.UU. en 1945.⁽³⁴⁾ Sin embargo, en 1946 se informó de la resistencia de las moscas domésticas al DDT debido a su uso generalizado y su uso indiscriminado que generó una ola de preocupación sobre sus efectos en la salud y el ambiente. Estos efectos fueron destacados por Rachel Carson en 1962 en el libro “primavera silenciosa”, el que, junto al creciente número de reportes sobre daños a plantas y animales hizo que su uso se restringiera y finalmente se prohibiera.

A partir de ese momento se originó la búsqueda de compuestos análogos menos tóxicos al ser humano, más efectivos y selectivos hacia las plagas. Así surgieron el BHC, aldrin, dieldrin, endrin, clordano, paratión, captan y 2,4-D. El DDT fue el más popular, debido a su amplio espectro de acción.⁽³⁰⁾

A lo largo de la década de 1950, los productores, consumidores y legisladores no se preocuparon demasiado por los riesgos potenciales que generaba el uso de pesticidas en la salud y el medio ambiente. Los alimentos eran más baratos, y además, se creía que la disminución en el número de reportes de personas intoxicadas y muertes implicaba un efecto menos nocivo de estos pesticidas comparados con los preparados de arsénico. En este período se desarrollaron

los compuestos organofosforados; en donde el malatión fue el primero reportado como de amplio espectro y baja toxicidad a los mamíferos. Una ventaja de estos compuestos organofosforados es que una vez aplicados se degradan rápidamente a productos no tóxicos, son de baja persistencia, no se bio-acumulan en el ambiente y ni en la cadena trófica como es el caso de los organoclorados.⁽³¹⁾

Otra familia relevante en cuanto a frecuencia de uso son los carbamatos. El carbaril, uno de los más representativos de este grupo se ha utilizado como sustituto del DDT desde el año 1956, para reducir la contaminación ambiental ya que se biodegrada rápidamente y no se acumula en el ambiente (**Tabla 3**).⁽³⁰⁾

En el año 1975 fueron desarrollados los herbicidas de la familia de las sulfonilureas, por DuPont Crop Protection. Estos herbicidas fueron comercializados por primera vez en el año 1982, para su uso en cultivos de cebada y trigo.

Así mismo en los años '80 se introdujo el herbicida glifosato, organofosforado, actualmente uno de los más vendidos a nivel mundial. También se comenzaron a utilizar las imidazolinonas, las dinitroanilinas, los de la familia ariloxifenoxipropionato, ciclohexanodionas, avermectinas, fenilureas, los triazoles, imidazoles, pirimidina, entre otros.⁽³¹⁾ Además comenzaron a desarrollarse pesticidas de origen biológico como el *Bacillus thuringiensis* (Bt). El uso de estos compuestos se ha extendido a nivel mundial, siendo muy utilizados por su compatibilidad con la tendencia mundial hacia el control de malezas post-emergencia y de manejo integrado de plagas.⁽³⁵⁾

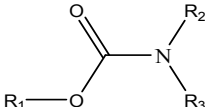
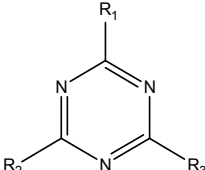
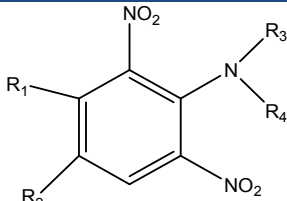
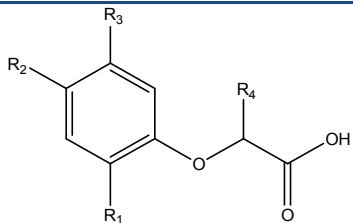
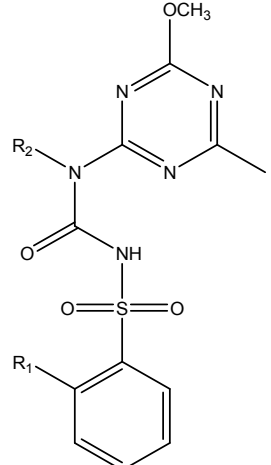
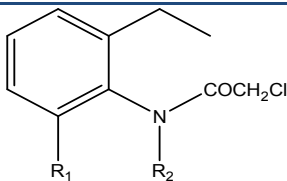
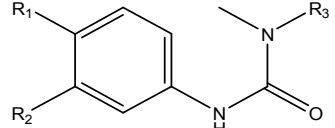
En la década de 1990 las actividades de investigación se concentraron en la búsqueda de nuevos miembros de familias ya existentes con mayor selectividad y menor impacto ambiental y toxicológico, introduciéndose nuevas familias tales como los herbicidas triazolpirimidina e isoxazol, los fungicidas estrobilurinas y los insecticidas cloronicotinilos, espinosin y diacilhidrazina. Una familia que ha adquirido elevada relevancia es la de los neonicotinoides, en donde el imidacloprid es uno de los más utilizados. Este insecticida fue introducido en Europa y Japón en los años 90 y registrado para su uso en EE.UU. en 1992. Los compuestos pertenecientes a esta familia fueron

sintetizados tomando como insecticida base a la nicotina.⁽³³⁾ Año a año se siguen introduciendo nuevos compuestos, desarrollándose formulaciones más seguras y amigables con el medio ambiente, con un aumento de la selectividad de los productos diseñados y con el fin de evitar la aparición de resistencia.^(30,31)

3.3. Clasificación de los pesticidas

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la estructura química y su uso, la vida media y la toxicidad. De acuerdo a su estructura química se nuclean en diversas familias, la **Tabla 3** muestra ejemplos de las familias más representativas.

Familia	Estructura	Sustituyente	Ejemplo
Organoclorados			DDT
Piretroides		R1: R2:-Cl R3:-Cl	Cipermetrina
Organofosforados		P=S R1:-CH ₂ CH ₃ R2:-CH ₂ CH ₃ P-O-X X: 	Diazinón
		P=O R1:-H R2:-H	Glifosato

		P-CH ₂ - NCH ₂ COOH	
Carbamatos		R1:  R2:-H R3:-CH ₃	Carbaril
Triazinas		R1:-CH ₂ CH ₃ R2:-CH-(ClH ₃) ₂ R3:-Cl	Atrazina
Dinitroanilina		R1:-CH ₃ R2:-CH ₃ R3:-H	Pendimetalfin
Fenoxiácido		R1:-Cl R2:-Cl R3:-H R4:-H	2,4-D
Sulfonilureas		R1:-COOH R2:-H	Metsufuron
Amidas		R1:-CH ₂ CH ₃ R2:-CH ₂ OCH ₃	Alaclor
Fenilureas		R1:(CH ₃) ₂ CH- R2:-H R3:-CH ₃	Isoproturon

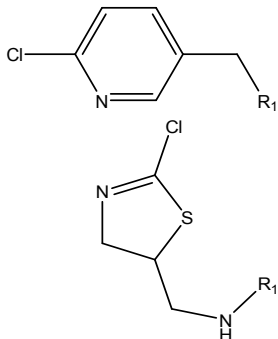
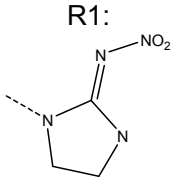
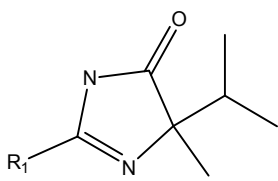
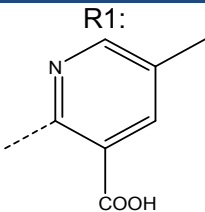
Neonicotinoides			Imidacloprid
Imidazolinonas			Imazapic

Tabla 3. Estructura y ejemplos de las principales familias de pesticidas.

Según su finalidad se clasifican en herbicidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas, nematocidas, acaricidas, bactericidas y otros. En la **Tabla 4** se encuentran listados los grupos más representativos según la finalidad de uso.⁽³⁶⁾

Acción	Familia Química	Ejemplos
Insecticida	Organoclorados	DDT, aldrin, endosulfán, endrin
	Organofosforados	Diazinón, clorpirifós, malatión
	Carbamatos	Carbaril, carbofurán, propoxur
	Piretroides	Cipermetrina, fenvalerato, permetrina
	Neonicotinoides	Imidacloprid, tiacloprid, tiametoxam
	Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina
Herbicida	Derivados bipiridilos	Diquat, paraquat
	Derivados de triazinas	Atrazina, simazina, terbutrín, propazina
	Sulfonilureas	Pirazosulfurón-etil, metsulfurón-metil, bensulfurón-metil, azimsulfurón
	Imidazolinonas	Imazapic, imazaquín, imazapir
	Sulfonamidas	Penoxulám, piroxulám
	Ureas	Diurón, linurón, fenurón
Fungicida	Imidazoles	Imazalil, procloraz, triflumizol
	Ditiocarbamatos	Maneb, mancozeb, propineb
	Estrobilurinas	Piraclostrobín, azoxistrobín, kresoxim-metil
	Triazoles	Tebuconazol, epoxiconazol, triadimefón, triadimenol

Tabla 4. Ejemplos de pesticidas según la familia química y modo de acción.

Según su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (**Tabla 5**).

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbaril
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrin, dieldrin
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

Tabla 5. Clasificación de los pesticidas según su persistencia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los pesticidas según su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (**Tabla 6**).⁽³⁷⁾ La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL₅₀) o de la concentración letal media (CL₅₀) en determinadas especies animales. Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, entre otras), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad o el sexo.⁽³⁷⁾ La EPA define a la toxicidad como el grado al cual una sustancia o mezcla de sustancias puede hacerle daño a los seres humanos o animales. Toxicidad aguda se refiere a efectos peligrosos en un organismo a través de una sola exposición o una exposición a corto plazo. Toxicidad crónica se refiere a la habilidad de una sustancia o mezcla de sustancias de causar efectos dañinos en un periodo de tiempo extenso, normalmente a través de exposiciones continuas o repetidas a veces durante toda la vida del organismo expuesto.⁽³⁸⁾

En nuestro país los productos fitosanitarios que sean comercializados deben, según el decreto 294/2004, presentar la clasificación toxicológica (basada en la clasificación de peligrosidad realizada por el Programa Internacional de Seguridad Química (PISQ) de la OMS según la **Figura 6**.⁽³⁹⁾

Clasificación de la OMS según Riesgo		LD50 Para rata (mg/ kg peso corporal)	
		oral	dérmica
Ia	Producto Sumamente Peligroso	< 5	< 50
Ib	Producto Muy Peligroso	5–50	50–200
II	Producto Moderadamente Peligroso	50–2000	200–2000
III	Producto Poco Peligroso	Más de 2000	Más de 2000
U	Productos que Normalmente no Ofrecen Peligro	5000 o más	

Tabla 6. Clasificación de los pesticidas según la Organización Mundial de la Salud, (Figura adaptada de OMS).⁽³⁷⁾

I a - Producto Sumamente Peligroso I b - Producto Muy Peligroso	MUY TOXICO TOXICO
II - Producto Moderadamente Peligroso	NOCIVO
III - Producto Poco Peligroso	CUIDADO
U- Productos que Normalmente no Ofrecen Peligro	CUIDADO

Figura 6. Clasificación toxicológica según la OMS, (Figura adaptada de OMS) ⁽³⁷⁾

3.4. Destino de los pesticidas

Se estima que menos del 45% de los pesticidas aplicados alcanza los cultivos y menos del 0,1% llega al organismo objetivo; el resto se incorpora al medio ambiente contaminando suelos, agua, aire o simplemente actúa sobre un

organismo no objetivo. Según sus características físico-químicas, pueden persistir por largos períodos en un ecosistema y por esta propiedad de persistencia, pueden incluso entrar en la cadena alimenticia, sufrir biomagnificación y acumularse en tejidos grasos del organismo, llegando a concentraciones mayores que las que se encuentra en el ambiente.^(40,41)

Según el modo o sitio de aplicación los pesticidas tienen diferentes destinos. Por ejemplo los que son aplicados por medios aéreos pueden contaminar el aire y finalmente terminar en el suelo o el agua.⁽⁴²⁾

De esta forma, el uso inadecuado de los plaguicidas puede alterar la productividad de los suelos, deteriorar la calidad de los recursos hídricos, alterar la reproducción y desarrollo de especies acuáticas y terrestres, así como provocar problemas inmunológicos, neurológicos, hormonales, e intoxicaciones en humanos y otros animales.^(43,44,45)

Aún en las mejores condiciones de uso, los pesticidas generan residuos que pueden persistir en el ambiente así como en los alimentos.

Según el *Codex*, un residuo de plaguicida es cualquier sustancia presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción y las impurezas consideradas de importancia toxicológica.⁽²⁵⁾

La UE define un residuo de producto fitosanitario como una o varias sustancias que se encuentren en o sobre vegetales o productos de origen vegetal, productos animales comestibles, o componentes del medio ambiente, que constituyan los restos de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción.⁽²⁶⁾

4. Ecosistema del Cultivo de Arroz

A pesar de que el sistema de cultivo de arroz en nuestro país es considerado sustentable la creciente demanda del arroz ha hecho que los cultivos se hayan ido intensificando. Generalmente la aplicación de un herbicida en un cultivo de arroz es seguida por la inundación del cultivo y, dependiendo de las prácticas agrícolas se aplican también fungicidas e insecticidas.

En función del manejo del agua realizado y de las precipitaciones, los pesticidas pueden persistir hasta su degradación en el área donde fueron aplicados o ser transportados fuera del área de cultivo, contaminando otros recursos naturales.⁽⁴⁶⁾ Por todos estos motivos se debe tener extrema precaución en el uso de fitosanitarios ya que por su acumulación o residualidad pueden suponer un riesgo no solo para el consumidor, sino también para el ambiente. Además es fundamental generar información respecto al impacto que pueden generar dichos agroquímicos en el ecosistema del arroz, para lo cual es necesario el desarrollo de metodologías que permitan el análisis de residuos de pesticidas en matrices representativas de dicho ecosistema como por ejemplo; suelo, agua y arroz.⁽⁴⁷⁾

4.1. Suelo

El suelo es un recurso prácticamente no renovable debido a que su cinética de degradación es rápida y, por el contrario, los procesos de formación y regeneración son extremadamente lentos. Se trata de un sistema muy dinámico que realiza muchas funciones y presta servicios vitales para las actividades humanas y la supervivencia de los ecosistemas, como son: la producción de biomasa; el almacenamiento, el filtrado y la transformación de nutrientes y agua; el alojamiento de la reserva de la biodiversidad; la actuación como plataforma de la mayor parte de las actividades humanas; la aportación de materias primas; la acumulación de una reserva de carbono y el almacenamiento del patrimonio arqueológico y geológico.⁽⁴⁸⁾

La degradación del suelo o su mejora, tienen un impacto fundamental en la protección de las aguas superficiales y subterráneas, la salud humana, la protección de la naturaleza, la biodiversidad, la agricultura y la seguridad alimentaria.⁽⁴⁸⁾ Muchos de los pesticidas utilizados en la agricultura presentan cierta persistencia en suelo y en general producen una disminución de la biodiversidad. Los herbicidas por ejemplo, disminuyen la cantidad de vegetación que cubre el suelo, promoviendo la erosión que ocurre entre otros factores por el viento y el escurrimiento. La erosión afecta la estructura de suelo y crea un desbalance en su fertilidad.⁽⁴²⁾ Existen principalmente 2 rutas

por donde estos contaminantes llegan al suelo; mediante la aplicación de pesticidas por spray o por la aplicación de las diferentes formulaciones directamente en el suelo.⁽⁴²⁾ Así mismo las diversas prácticas de limpieza y manipulación de los utensilios y maquinarias utilizadas para dichas aplicaciones son también una vía de contaminación.

El comportamiento de los pesticidas en el suelo depende de las características de este y está gobernado por diferentes mecanismos: adsorción-desorción, lixiviación (leaching), volatilización, solubilidad y escurrimiento que controlan la transferencia de estos contaminantes desde el suelo al agua, aire o a los alimentos.^{(40),(41)} Además estos contaminantes pueden sufrir transformaciones mediante procesos de degradación química y/o biológica.^(41,49) Todos estos procesos se muestran esquematizados en la **Figura 7**.

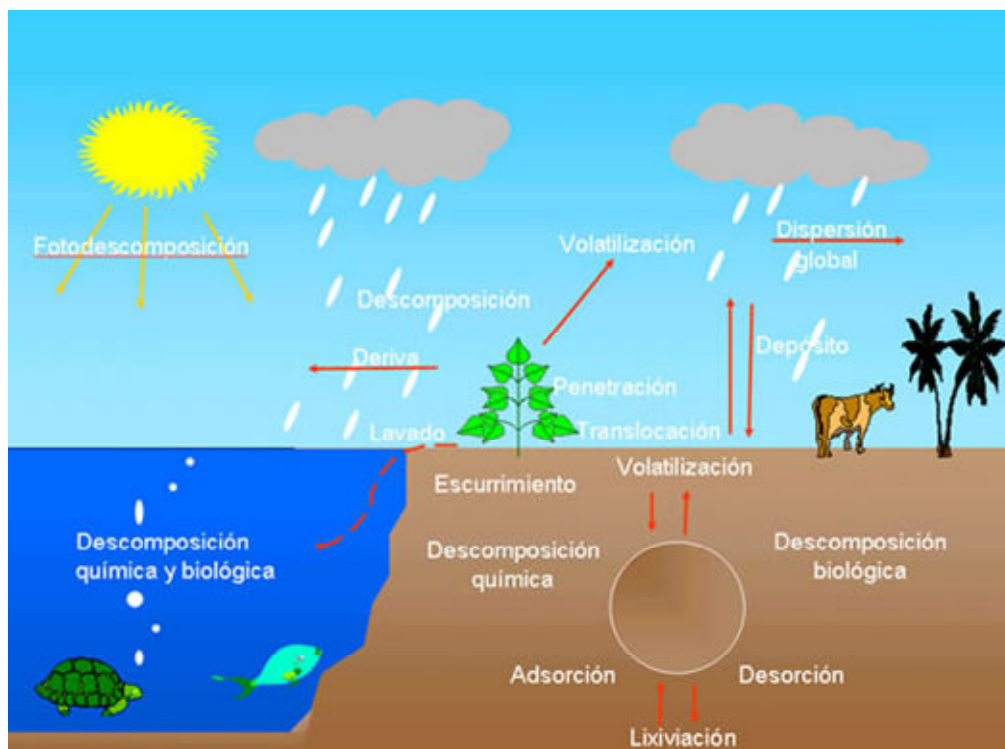


Figura 7. Posibles mecanismos de transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente, (Figura adaptada de www.ine.gob.mx).⁽⁵⁰⁾

Es importante conocer estos procesos para predecir el destino de un pesticida en el ambiente. Entre los principales procesos que sufren dichos contaminantes se encuentran:

Adsorción-desorción: se mide mediante el coeficiente de partición (K_{oc}), que es la tendencia de los pesticidas a permanecer atrapados a las partículas de suelo. Valores de K_{oc} mayores a 1000 indican una gran atracción por el suelo y por lo tanto una baja movilidad, a menos que el suelo se encuentre erosionado. Valores menores que 500 indican que los compuestos tienden a moverse ya sea mediante escurrimiento o infiltración. Aquellos pesticidas que son adsorbidos por el suelo se encuentran menos accesibles a los microorganismos por lo que la adsorción limita tanto su degradación como su transporte.^(41,51)

Solubilidad: indica la facilidad con que un pesticida puede ser lavado del cultivo, penetrar en el suelo o sufrir escurrimiento. Pesticidas cuya solubilidad es menor que 1 parte por millón (ppm) tienden a permanecer en la superficie del suelo, en caso de que éste se encuentre erosionado pueden sufrir escurrimiento.⁽⁴¹⁾

Volatilidad: se expresa a través de la Constante de Henry (H). Un valor de H alto indica una tendencia a la volatilización. La volatilización de un contaminante en general es mínima en comparación con otros procesos como el escurrimiento y además puede disminuir mediante su adsorción en las partículas de suelo. A su vez, los pesticidas volátiles pueden re-depositarse en el suelo por acción de la lluvia. La tasa de volatilización depende de las características del suelo y de factores ambientales como la temperatura, la humedad y el viento.⁽⁴¹⁾

Escorrentía (runoff): es el movimiento del agua en una superficie inclinada y ocurre cuando la cantidad de agua presente es mayor a la que es capaz de penetrar en el suelo. Aquellos pesticidas solubles en el agua o unidos a partículas de suelo erosionado pueden ser movilizados mediante este mecanismo contaminando arroyos y lagos, pudiendo terminar en aguas superficiales, afectando a plantas y animales, o en aguas subterráneas.⁽⁵²⁾

Lixiviación (leaching): es el movimiento de los pesticidas a través del suelo. Este proceso está influenciado por las características del suelo, del pesticida y factores climáticos como la lluvia. Una alta solubilidad del pesticida en agua y bajo K_{oc} , lluvias luego de su aplicación y suelo arenoso aumentan la probabilidad de que ocurra lixiviación.⁽⁵²⁾

Degradación: es fundamental para atenuar la concentración de pesticidas en suelo. Puede producirse por factores bióticos o abióticos y depende de las características del pesticida y de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo.⁽⁴⁰⁾

La **biodegradación** es el resultado del metabolismo microbiano de compuestos orgánicos para formar metabolitos que difieren en la estructura y propiedades tóxicas del compuesto original. Ocurre cuando hongos, bacterias u otros microorganismos del suelo usan pesticidas como fuente de carbono y energía. El contenido de materia orgánica, temperatura, humedad, aireación y pH afectan este proceso.⁽³⁾

La **degradación química** ocurre por diferentes reacciones tales como ionización, relacionada con el pH del suelo, hidrólisis o procesos de oxidación-reducción. Además las sustancias orgánicas como los pesticidas pueden sufrir procesos de foto-degradación en hojas, suelo, agua y aire dependiendo de algunos factores tales como: intensidad de la luz solar, tiempo de exposición, propiedades del pesticida y modo de aplicación.^(3,52)

4.1.1. Características del suelo

4.1.1.1. Textura

La textura y estructura del suelo juegan un factor primordial en el transporte de los pesticidas en el ambiente. La textura de un suelo representa el porcentaje en que se encuentran los elementos que lo constituyen; arena gruesa, arena media, arena fina, limo y arcilla.⁽⁵³⁾ Suelos de textura fina poseen una mayor área superficial y menor permeabilidad y por lo tanto otorgan mayores tiempos de contacto y mayor área de adsorción. Suelos con alto contenido en arcilla, con pequeño tamaño de poro y una gran área superficial pueden presentar una ventaja al momento de atenuar la concentración de pesticidas. Suelos muy arenosos permiten que el agua se desplace muy fácilmente, no retienen a los pesticidas y además no contienen tantos organismos como para que ocurra degradación.⁽⁴¹⁾ El contenido de materia orgánica también condiciona la adsorción de un contaminante y el nivel de actividad biológica en el suelo.⁽³⁾

A partir del triangulo textural de los suelos representado en la **Figura 8** y conociendo el porcentaje en limo, arcilla y arena se puede tener una aproximación de la textura de un determinado suelo.⁽⁵³⁾

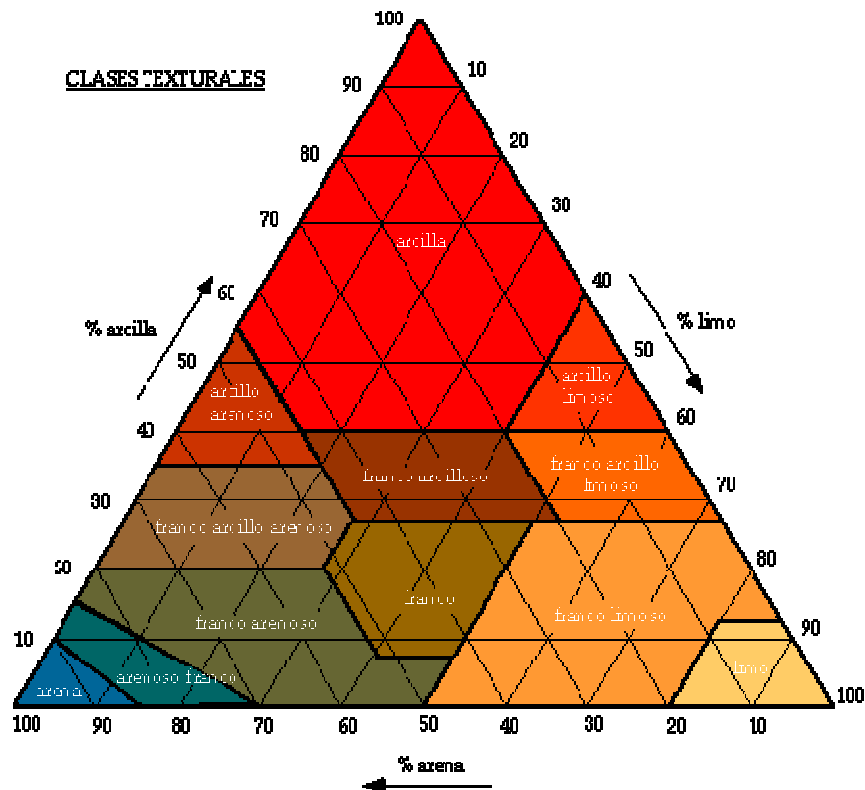


Figura 8. Diagrama textural de suelo.⁽⁵⁴⁾

4.1.1.2. pH

La adsorción de un pesticida en el suelo no solo depende de la naturaleza química del compuesto sino también del pH del suelo. Un aumento del pH hace que los pesticidas débilmente ácidos se ionicen y sufran repulsión con las partículas de suelo cargadas, disminuyendo así la adsorción.^(49,55) La adsorción de contaminantes orgánicos alcanza un máximo a valores de pH cercanos al pKa del compuesto. Si el pH del suelo es mayor que el pKa de los pesticidas, estos se encontrarán como moléculas neutras y el proceso de adsorción estará gobernado por fuerzas del tipo puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas.⁽⁴⁹⁾ Pero este proceso prácticamente no tiene

relevancia comparada con las reacciones de intercambio catiónico, por lo que la adsorción de los pesticidas es escasa favoreciendo su movilidad.^(49,55)

4.1.1.3. Legislación sobre protección del suelo

La Unión Europea en julio de 2002 crea el VI programa de acción comunitario en materia de medio ambiente (*Decisión No 1600/2002/CE*).⁽⁵⁶⁾ Uno de los objetivos de este programa es contribuir a un alto nivel de calidad de vida y bienestar social para los ciudadanos, proporcionando un medio ambiente en el que los niveles de contaminación no tengan efectos perjudiciales sobre la salud humana y el medio ambiente fomentando un desarrollo urbano sostenible. Presta especial atención a la prevención de la erosión del suelo, su deterioro y contaminación para lograr su uso de forma sostenible. Los objetivos y ámbitos prioritarios de actuación sobre el medio ambiente, la salud y la calidad de vida están enmarcados en lograr un uso más sostenible de los plaguicidas de forma de proteger las cosechas así como lograr una importante reducción de los riesgos asociados a su uso. Plantea, siempre que sea posible, la posibilidad de sustituir aquellos plaguicidas persistentes, tóxicos o que sufren bio-acumulación, por otros menos peligrosos. Fomenta prácticas agrícolas que impliquen un uso reducido de plaguicidas o que no los utilicen, promoviendo la utilización de códigos de buenas prácticas.⁽⁵⁶⁾

En nuestro país la *Ley 15.239* rige la conservación del suelo y aguas en donde se declara de interés nacional promover y regular el uso y la conservación de los suelos y de las aguas superficiales destinadas a fines agropecuarios.⁽⁵⁷⁾ Además establece que el Estado debe prevenir y controlar la erosión y degradación de los suelos, las inundaciones y la sedimentación en cursos de agua, en los lagos y lagunas naturales y artificiales. En el *Decreto 405/08*,⁽⁵⁸⁾ con el fin de lograr una conservación, uso y manejo adecuado del suelo y del agua se establece que dadas las nuevas tendencias en el uso intensivo del suelo algunas prácticas se consideran inadecuadas, por ejemplo para el caso de siembra directa se considera inadecuado: 1)- aplicación de herbicidas en los desagües naturales del terreno; 2)- aplicación de herbicidas fuera del área del cultivo, como caminos y franjas contra los alambrados; 3)- aplicación de

herbicidas en predios linderos y caminos o rutas de jurisdicción departamental o nacional.

Tanto en la Unión Europea como en nuestro país existen reglamentaciones con el fin de conservar la calidad del suelo, principalmente en cuanto a la erosión y degradación, pero no establecen una lista de sustancias que podrían considerarse contaminantes en suelo ni las concentraciones máximas admisibles de dichos contaminantes.

4.2. Agua

Las mayores concentraciones de productos químicos agrícolas en agua resultan en general de procesos de percolación, escorrentía o filtración de contaminantes a través del suelo, ó simplemente, pueden desviarse fuera de los cultivos cuando son aplicados por spray. Además el proceso de erosión del suelo, contribuye con la presencia de los pesticidas en los cursos de agua. Los principales factores que favorecen la presencia de los pesticidas en el ambiente son: tipo de suelo, clima, la presencia/ausencia de un cultivo, el método de aplicación del pesticida, la distancia que existe entre el punto de aplicación y los cursos de agua y las propiedades físico-químicas de los pesticidas, en particular su solubilidad en agua.^(3,42)

El agua subterránea puede ser contaminada por la lixiviación de los agroquímicos a través de suelos muy agrietados y erosionados.

Por otro lado las aguas superficiales son particularmente propensas a la contaminación por malas prácticas agrícolas, tales como la disposición inadecuada de exceso de productos químicos, el vertido del agua del lavado del equipo de aplicación y derrames accidentales.⁽⁵⁹⁾ Generalmente los agroquímicos se aplican directamente en las plantas (pulverización foliar, etc.) o en el suelo, y las concentraciones en las aguas superficiales dependerá de factores tales como las tasas de aplicación (incluyendo sobre aplicación y mala aplicación), características del suelo, el clima (en particular lluvia) y el sistema de riego.⁽⁵⁹⁾

El riego y el drenaje pueden desempeñar un papel importante en el transporte de contaminantes desde su origen hasta los cursos de agua. También pueden

afectar la calidad del agua subterránea mediante la alteración del equilibrio del agua y las sales del suelo, que a su vez cambia sus características físico-químicas, produciendo la lixiviación de sustancias químicas a través del suelo.⁽⁵⁹⁾

Varios programas de monitoreo de agua han reportado la presencia de pesticidas, ya sea en aguas superficiales como subterráneas.⁽⁵¹⁾

4.2.1. Agua en el ecosistema del arroz

En diferentes zonas donde se cultiva arroz (UE, Trópico, Asia) se ha identificado a este cultivo como uno de los principales agro-ecosistemas que contribuyen con la contaminación por pesticidas al medio ambiente. Esto se atribuye a las relativamente grandes cantidades de plaguicidas aplicados en el cultivo y a la práctica común de drenar el agua del arroz en los canales de riego que eventualmente fluyen al sistema de agua dulce y luego al medio marino.⁽⁶⁰⁾

En los campos de arroz en particular, los herbicidas aplicados se dispersan muy fácilmente, ya sea por el drenando o por escurrimiento, terminando en los canales de riego o pequeños ríos y arroyos que finalmente vierten a cursos de agua de mayor tamaño. Además es importante destacar que la práctica de inundación de los suelos usados para el cultivo de arroz ha resultado en cambios significativos en las características físico-químicas y biológicas del suelo, que a su vez ejercen una influencia importante en la persistencia de los plaguicidas aplicados en el campo de arroz.⁽⁶¹⁾

Así mismo, los campos de arroz inundados, se han convertido en el hábitat de una variedad de especies que han adaptado su ciclo de vida a este cultivo. Incluso varios de estos organismos desempeñan una función importante como agentes de control biológico de vectores y plagas, conservando así el equilibrio del ecosistema que, en muchos casos, no requiere la aplicación de insecticidas.⁽⁶²⁾ Existen pocos estudios específicos sobre los efectos de los pesticidas en los organismos acuáticos presentes en el ecosistema del cultivo de arroz, pero algunos autores denuncian una disminución en la cantidad de organismos acuáticos en los últimos años, principalmente en Asia.⁽⁶²⁾

En 2005, el 8% de los plaguicidas que se utilizan comúnmente se encontraban por encima del valor umbral establecido.⁽⁶³⁾ Diversos estudios a nivel mundial reportaron la presencia de contaminación por pesticidas tanto en aguas superficiales y subterráneas, en zonas ocupadas por la horticultura intensiva, como los cultivos de arroz y otro tipo de cultivos, algunos incluso excediendo los límites establecidos.^(61,63)

4.2.2. Legislación sobre protección del agua

Desde los años 70 la Unión Europea ha llevado a cabo una expansión y reestructuración de su política en materia de agua. Las primeras legislaciones referentes al agua surgieron en los años 1970 y 1980, con el objetivo de lograr niveles de calidad aceptables para ciertos tipos de agua como la de baño (*Directiva 76/464/CEE*)⁽⁶⁴⁾ y la destinada al consumo humano, (*Directiva 80/778/CEE*)⁽⁶⁵⁾ que establece una concentración máxima de un pesticida de 0,1 µg/L excepto para aldrin, la dieldrin, el heptacloro y el heptaclorepóxido cuya concentración máxima es de 0,03 µg/L. Además establece que la concentración total de los pesticidas presentes no puede ser mayor de 0,5 µg/L. Esta ley es derogada en el año 1998 y actualmente está en vigencia la *Directiva 98/83/CE*.⁽⁶⁶⁾

En los años 90 surgió la *Directiva 91/271/EEC* de Aguas Residuales Urbanas.⁽⁶⁷⁾ En el año 2000 surge la Directiva Marco del Agua (*Directiva 2000/60/EC*)⁽⁶⁸⁾, reemplazada en el año 2008, por la *Directiva 2008/105/EC*.⁽⁶⁹⁾ Esta directiva establece un nuevo régimen para la prevención y el control de la contaminación química de aguas superficiales y subterráneas, incluyendo estuarios y aguas costeras. Su objetivo primordial es prevenir el deterioro del agua, promover el uso y consumo sostenible, basado en una protección del recurso a largo plazo y contribuir a ofrecer agua con una calidad (ecológica y química). Paralelamente, en el año 2001 se aprueba la primera lista de sustancias prioritarias, *Decisión 2455/2001/CE*,⁽⁷⁰⁾ en la que figuran 33 sustancias o grupos de sustancias. Esos contaminantes se han clasificado como “sustancias prioritarias” y son un número limitado de contaminantes químicos cuya presencia en las aguas superficiales de la UE se considera

especialmente preocupante por su gran uso así como por las altas concentraciones que se registran en ríos, lagos y aguas costeras.⁽⁷⁰⁾ Hay además, una subcategoría de “sustancias peligrosas prioritarias”, a las que se aplican objetivos ambientales más estrictos por su gran persistencia, bio-acumulación y toxicidad. Esta lista incluye varios tipos de contaminantes de los cuales 7 son pesticidas. Y además establece otros pesticidas como el bentazone, el glifosato y uno de sus metabolitos (AMPA), el dicofol y el mecoprop que continúan en consideración como potenciales sustancias prioritarias.⁽⁷⁰⁾ La concentración máxima establecida para estas sustancias prioritarias se encuentra en la **Tabla 7**. Además en el 2006 surge la *Directiva 2006/118/EC* ⁽⁷¹⁾ con el fin de proteger las aguas subterráneas en la que se establecen los límites máximos de nitratos y de residuos de pesticidas. En esta directiva se exige una concentración máxima de 0,1 µg/L para cada pesticida individual y una concentración máxima de 0,5 µg/L para la suma de los pesticidas detectados en una muestra.

	AA-EQS (aguas superficiales continentales)	AA-EQS (otras aguas superficiales)	MAC-EQS (aguas superficiales continentales)	MAC-EQS (otras aguas superficiales)
Alaclor	0,3	0,3	0,7	0,7
Atrazina	0,6	0,6	2,0	2,0
Clorfenvinfos	0,1	0,1	0,3	0,3
Clorpirifós-etil	0,03	0,03	0,1	0,1
Aldrin	Σ0,01	Σ0,005	No aplicable	No aplicable
Dieldrin				
Endrin				
Esodrin				
DDT (total)	No aplicable	0,025	0,025	No aplicable
p-DDT	0,01	0,01	No aplicable	No aplicable
Diurón	0,2	0,2	1,8	1,8
Endosulfán	0,005	0,0005	0,01	0,004
Isoproturón	0,3	0,3	1,0	1,0
Simazina	1	1	4	4
Trifluralina	0,03	0,03	No aplicable	No aplicable

Tabla 7. Lista de sustancias prioritarias en agua y sus concentraciones expresadas en µg/L, Decisión 2455/2001/CE; AA: Promedio Anual (del inglés, Annual Average); EQS: Estándares de Calidad Ambiental (del inglés, Environmental Quality Standards); MAC: Concentración Máxima Admitida (del inglés, Maximum Allowable Concentration).

En Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA) es la responsable de la calidad del agua subterránea, superficial y del agua potable. En este sentido en los años 90 surgió la Regulación Nacional para Agua Potable (National Primary Drinking Water Regulations), en donde se establecen niveles máximos de contaminantes (MCL) en agua potable para casi 100 sustancias orgánicas e inorgánicas, entre ellos 20 pesticidas.⁽⁷²⁾ Además existen algunas leyes relacionadas con pesticidas que intentan evitar la contaminación de aguas subterráneas como por ejemplo la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas, que autoriza a la EPA para controlar la disponibilidad de los plaguicidas que tienen la capacidad de filtrarse en las aguas subterráneas.⁽⁷³⁾ Por otro lado la EPA define los criterios de calidad de las aguas superficiales recomendados a nivel nacional para la protección de la vida acuática y la salud humana en alrededor de 150 contaminantes. Estos criterios se publican de conformidad con la Ley de Agua Limpia (CWA) y proporciona una guía de calidad del agua para los diferentes estados de EE.UU.⁽⁷⁴⁾

En nuestro país, en el año 1979 se establece el *Decreto 253/79* ⁽⁷⁵⁾ que por un lado clasifica los cursos de agua del País en 4 clases:

Clase 1: Aguas destinadas o que puedan ser destinadas al abastecimiento de agua potable.

Clase 2: a) Aguas destinadas al riego de frutas y hortalizas u otros cultivos destinados al consumo humano, cuando el riego produce el mojado del producto.

b) Aguas destinadas a recreación por contacto directo con el cuerpo humano.

Clase 3: Aguas destinadas a la preservación de los peces y de otros integrantes de la flora y fauna hídrica, o aguas destinadas al riego de cultivos cuyo producto no se consume en forma natural.

Clase 4: Aguas correspondientes a los cursos que atraviesan zonas urbanas o suburbanas que mantengan una armonía con el medio, o aguas destinadas al riego de cultivos cuyos productos no son destinados al consumo humano en ninguna forma.

Por otro lado establece parámetros de calidad y estándares de forma de evaluar la calidad del agua, tal como el nivel de tóxicos orgánicos en el agua

clase 1, 2a, 2b, y 3 donde se incluyen: aldrin, dieldrin, clordano, DDT, endosulfán, endrin, heptacloro y heptacloro epoxi, mirex, 2,4-D, lindano, metoxicloro, 2,4,5-T, 2,4,5-TP y paratión en concentraciones desde 0,001-10 µg/L. Dicho decreto le da la potestad al Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) de modificar la lista de dichos tóxicos orgánicos según su uso.

Con respecto al agua potable, en el capítulo 25 del Reglamento Bromatológico Nacional, *Decreto 315/99* ^(76,77) se admite una concentración máxima de pesticidas de 0,5 µg/L. En el 2011, tomando en cuenta los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la EPA, surge el decreto 375/011 en el cual se modifica el Reglamento Bromatológico Nacional en su sección 1: Aguas. En el decreto 375/011 se re-definen los parámetros del agua potable y sus valores máximos admitidos, los cuales están establecidos en la NORMA UNIT 833 y se presentan en la **Tabla 8.** ⁽⁷⁸⁾

Pesticida	VMP (Valor máximo Permitido), (µg/L)	Pesticida	VMP (Valor máximo Permitido), (µg/L)
2,4-D	30	Dimetoato	6
2,4 DB	90	Endrin	2
2,4,5-T	9	Fenoprop	9
Alaclor	20	Glifosato + AMPA	700
Aldrin y Dieldrin	0,03	Lindano	2
Atrazina	3	Metoxicloro	20
Clorotolurón	30	Molinato	6
Clorpirifós	30	Permetrina	20
DDT (total de isómeros)	1	Trifluralina	20
Diclorprop	100	Simazina	2

Tabla 8. Valores Máximos Permitidos, Norma UNIT 833:2008. ⁽⁷⁸⁾

4.3. Arroz

4.3.1. Origen e historia

El arroz es uno de los cultivos más antiguos. Se domesticó hace miles de años en Asia y en África. Se extendió por China y por toda Asia 3.000 años antes de nuestra era. Europa lo conoció durante la conquista de la India. ⁽⁷⁹⁾ En España fue difundido hace más de 6 siglos por los árabes y con el descubrimiento de

América se extendió a Italia, Centro y Sudamérica. En Estados Unidos su cultivo se desarrolló alrededor del año 1685 en Carolina del Sur a partir del trabajo de los esclavos negros que llegaban de África.⁽⁸⁰⁾

Durante siglos, el arroz ha marcado la cultura y los hábitos alimenticios, casi todas las culturas tienen su propio estilo de consumir arroz que de hecho, forman parte del patrimonio cultural mundial.⁽⁸¹⁾

4.3.2. Especies de arroz

Estudios recientes reconocen cerca de 15 especies de arroz, pero todas las especies cultivadas pertenecen a dos especies: la variedad asiática: *Oryza sativa* y la africana *Oryza glaberrima*.

Oryza sativa proviene del Extremo Oriente al pie del Himalaya. A partir de ella se originan 2 subespecies, la *O. sativa* var. *japónica* y la *O. sativa* var. *indica*. La gran mayoría de las variedades que se cultivan pertenecen a esta especie, que se caracteriza por su plasticidad y por su cualidad gustativa. Actualmente los cultivos de *Oryza sativa* se obtienen a través de cruzamientos y combinaciones inter-raciales y se distribuyen por todo el mundo.⁽⁸⁰⁾

La variedad africana, *Oryza glaberrima*, es una especie anual originaria de África occidental, desde el delta central del Níger hasta Senegal y presenta una menor diversidad.⁽⁵⁾

4.3.3. Tipos de cultivo

Según el Instituto Internacional de Investigación de Arroz (IRRI) existen 4 tipos de cultivo: arroz de riego, arroz de secano en “tierras altas”, arroz de secano en “tierras bajas” ⁽⁴⁾ y arroz flotantes o inundados, capaces de vivir a una cierta profundidad en el agua y que se encuentran en sitios de Asia como en Bangladesh, delta del Mekong, etc. La altura de la planta puede variar desde 0,4 a 5 m en algunos arroz flotantes.^(47,82)

El arroz de riego provee el 75% de la producción mundial y cubre aproximadamente la mitad del área de arroz cosechada a nivel mundial, incluyendo América, Europa, Australia y parte de Asia y África. En este sistema

el agua es mantenida en una capa de 2,5-15 cm dependiendo de su disponibilidad. Las variedades apropiadas para el cultivo de riego son de pequeño tamaño, muy sensibles a la oferta de N, resistentes a muchas pestes y con un alto potencial de rendimiento.⁽⁴⁾

El arroz de secano de tierras bajas se cultiva principalmente en la orilla de los ríos una vez que finaliza la estación de lluvias y las aguas se retiran. Esta forma de cultivo se desarrolla en general en áreas de clima adverso y de tierras poco fértiles. Como consecuencia, los rendimientos son variables, y en general, bajos. El cultivo de arroz de secano representa aproximadamente el 13% de la superficie cosechada en el mundo y el 4% de la producción mundial de arroz. El cultivo en tierras altas, está presente en algunos países africanos y asiáticos y en Brasil donde el cultivo en seco representa más del 50% del total de la superficie dedicada al arroz.⁽⁴⁾

El cultivo de arroz inundado cubre un 7% del área de arroz cultivada, encontrándose en el Sur y Sudeste Asiático (Bangladesh, Tailandia, Camboya, Sumatra), en África del Oeste y en América del Sur. Los rendimientos son bajos, principalmente debido a los riesgos climatológicos (sequías e inundaciones) y al bajo potencial de producción de cultivares tradicionales plantados con pocos insumos.⁽⁵⁾

4.3.4. Requerimientos edafoclimáticos

4.3.4.1. Clima

Se trata de un cultivo subtropical y tropical, pero también se puede cultivar en climas templados y mediterráneos. Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 2500 metros de altitud.^(4,47,80)

4.3.4.1.1. Temperatura

El arroz necesita para germinar un mínimo de 10-13°C, considerándose su óptimo entre 30-35 °C. La temperatura mínima a la cual pueden desarrollarse el tallo, las hojas y raíces es 7 °C, siendo la temperatura óptima 23 °C.⁽⁴⁷⁾ A temperaturas superiores las plantas crecen más rápidamente, pero los tejidos

se hacen demasiado blandos e inconsistentes, siendo más susceptibles a los ataques de enfermedades.^(4,47,80)

4.3.4.2. Suelo

El cultivo tiene lugar en una amplia gama de suelos, desde arenosos a arcillosos.⁽⁴⁷⁾ El contenido de materia orgánica es muy variable, desde un mínimo de 0,5% hasta un máximo de 14%. En general en los suelos profundos se obtiene un mayor rendimiento que en suelos que poseen capas en donde el agua y los nutrientes fluyen poco. Los suelos arcillosos con alto contenido en limo son adecuados ya que se caracterizan por la lenta percolación del agua.⁽⁴⁾ El pH de los suelos en donde se cultiva el arroz es muy variable. En Italia por ejemplo es ácido (pH 4,5-6,8) mientras que en Francia, el suelo es rico en material calcáreo y el pH se encuentra en el rango de 7,5-8,5. La mayoría de los suelos tienden a cambiar su pH hacia la neutralidad pocas semanas después de la inundación. El pH de los suelos ácidos aumenta con la inundación mientras que para los suelos alcalinos ocurre lo contrario.^(4,47,80)

4.3.5. Morfología y taxonomía

El arroz (*Oryza sativa*, L.) es una planta monocotiledónea perteneciente a la subfamilia *Poaceae* de la familia de las gramíneas.⁽⁴⁷⁾ Es una planta herbácea, anual, posee muchas variaciones, pero generalmente es de vida corta, con una vida media de 3-7 meses, dependiendo del clima y la variedad. La planta está constituida por las siguientes partes:

-Raíces: delgadas, fibrosas y fasciculadas con dos tipos de raíces: las seminales temporales, y las raíces adventicias secundarias que emergen posteriormente (**Figura 9 a**).^(47,83,84)

-Tallo: erguido, cilíndrico y glabro, de 60-120 cm de longitud, formado de entrenudos de diferente longitud, limitados por nudos. La altura de la planta de arroz está determinada por la longitud y número de los entrenudos, que son caracteres varietales definidos (**Figura 9 b**).⁽⁴⁷⁾

-**Hojas:** alternas, envainadas, con el limbo lineal, agudo, largo y plano. Su longitud es variable. En una hoja completa se distinguen: la vaina, el cuello y la lámina. **(Figura 9 c).** ^(47,83,84)

-**Flores:** de color verde blanquecino, en espiguillas.⁽⁴⁷⁾ Su conjunto constituye una panícula grande, terminal, estrecha y colgante. La espiguilla es la unidad básica de la inflorescencia y está unida a las ramificaciones por el pedicelo. Una espiguilla consta de dos lemas estériles, la raquilla y la florecilla. Las lemas estériles envuelven la flor por debajo de la raquilla, el eje que sostiene la flor. Las brácteas llamadas glumas son: la lema y la palea. Estas brácteas superiores posteriormente formarán la cáscara de la semilla **(Figura 9 d y e).** ^(83,84)

-**Grano de arroz:** es un ovario maduro, seco e indehisciente. Consta de la cáscara formada por la lema y la palea con el embrión, situado en el lado ventral de la semilla cerca de la lema, y el endospermo, que provee alimento al embrión durante la germinación. Debajo de la lema y la palea hay tres capas de células que constituyen el pericarpio; debajo de éstas se encuentran dos capas, el tegumento y la aleurona. El grano de arroz descascarado es una carióspside; se conoce con el nombre de arroz integral que aún conserva el pericarpio de color marrón rojizo o púrpura **(Figura 9 f).** ^(47,83,84)

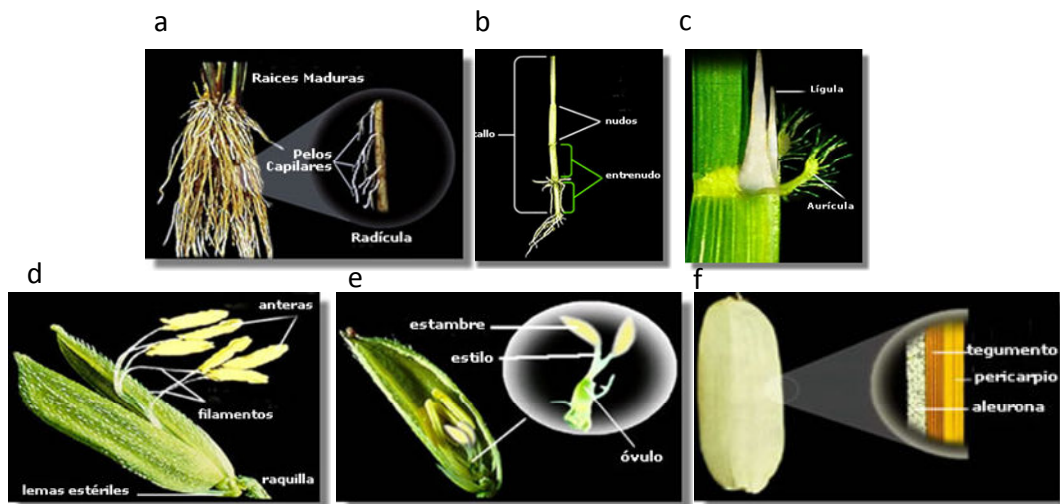


Figura 9. Morfología y Taxonomía de la planta de arroz. a. raíz, b. tallo, c. hoja, d. y e. flor, f. grano.

(Fotografías adaptadas de <http://webapp.ciat.cgiar.org/riceweb/morphology.htm>)⁽⁸⁴⁾

4.3.6. Variedades de arroz

A lo largo de la historia se ha intentado clasificar las diferentes variedades de arroz cultivadas en el mundo con el fin de facilitar su estudio. La mayoría de las clasificaciones han sido en base a los caracteres externos del grano, pero debido a que por diferentes factores edafoclimáticos se originan un gran número de variedades, agruparlas según los caracteres externos del grano no ha sido útil. Otras formas de clasificación han sido: según las necesidades del cultivo, en “acuáticas o de llanura” y de “secano o montaña”, o en función de la presencia o ausencia de barbas.⁽⁴⁷⁾ Teniendo en cuenta las dificultades que implica la clasificación según los caracteres botánicos de la planta, EE.UU. clasifica el grano según el tipo de arroz producido:

- De grano largo: los granos tienen una longitud media, superior a 6 mm y una razón longitud/ancho superior a 3 mm.
- De grano semi-largo o medio: los granos tienen una longitud media comprendida entre 5,2-6 mm y una razón longitud/anchura inferior a 3 mm.
- De grano redondo: los granos tienen una longitud inferior o igual a 5,2 mm y una razón longitud/anchura inferior a 2 mm.⁽⁷⁹⁾

4.3.7. Procesamiento del arroz

Cuando el arroz es cosechado, posee una cáscara no comestible que protege al grano. Además, contiene un 19-23% de humedad, lo que lo hace vulnerable al ardido si no es secado rápidamente. El grano ingresa a la planta industrial húmedo y sucio. En la planta de secado se eliminan en una primera instancia la paja y otros elementos extraños. Este grano limpio ingresa al secador, en donde se seca hasta un 13% de humedad, que es el porcentaje adecuado para almacenarlo o pasarlo a molino, según las necesidades. En esta etapa el arroz se llama arroz paddy. El arroz paddy sufre diferentes procesos dependiendo del producto que se desee obtener.⁽⁸⁵⁾

A continuación se realiza un proceso primario de molienda que incluye el pelado y la remoción de las capas externas de salvado mediante una descascaradora que elimina la cáscara, mediante la fricción de rodillos de

goma. El arroz obtenido en esta etapa del proceso se llama arroz integral o cargo, con el afrechillo cubriendo el grano. El arroz cargo es procesado por pulidoras que pulen los granos mediante la fricción de los mismos con presión en rodillos de piedra o de acero para eliminar los restos de afrechillo y producir arroz blanco o pulido.⁽⁸⁶⁾ Este proceso requiere de sumo cuidado, para prevenir una excesiva rotura y así mejorar el rendimiento.

El arroz parboiled, se produce a partir del arroz paddy, al cual es remojado y precocinado al vapor, evitando que la humedad no exceda el 40%.⁽⁸⁵⁾ El arroz es luego secado y siempre en la forma paddy se realiza un proceso de pre molienda para remover la cáscara y el salvado.

Durante el procesamiento del arroz se obtienen diferentes subproductos, arroz medio grano (quebrado), afrechillo, cáscara (**Figura 10**), dependiendo de la efectividad del proceso de molienda. Estos subproductos poseen diferentes fines, tales como: alimento para ganado y horticultura, entre otros.⁽⁸⁵⁾

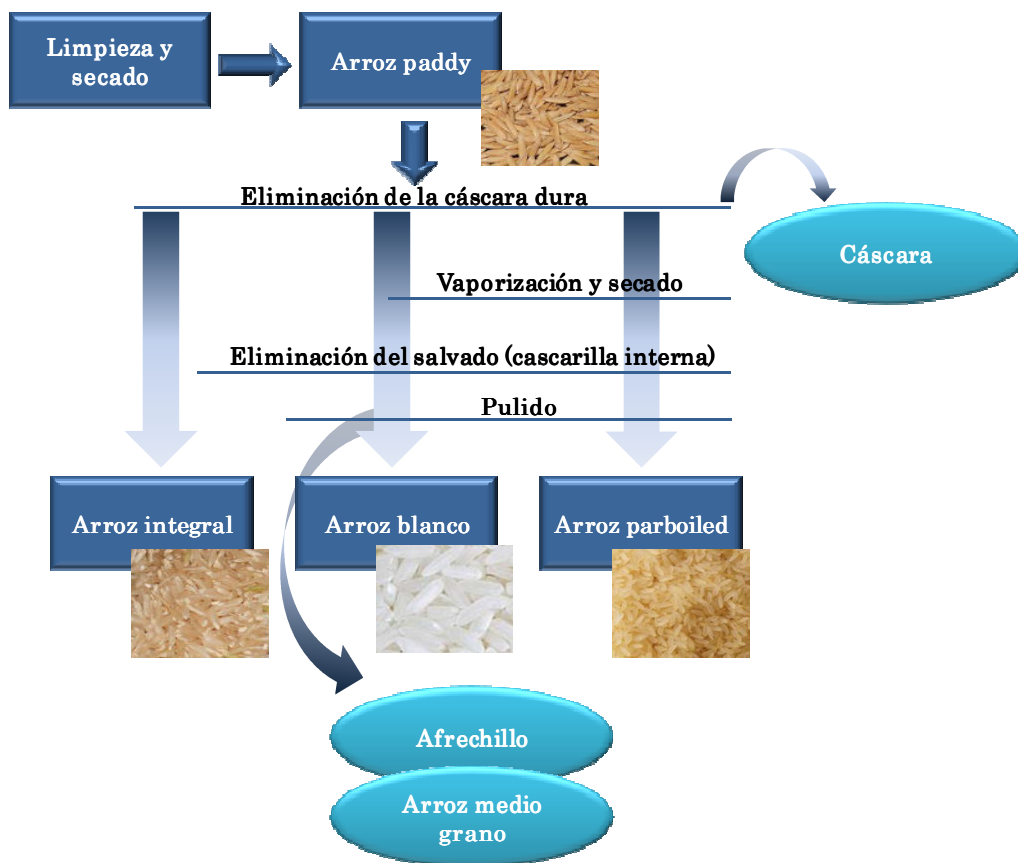


Figura 10. Principales productos que se obtienen durante el procesamiento del arroz.

4.3.7.1. Composición del arroz paddy y los principales productos luego de su procesamiento

El arroz paddy está formado por un 18-28% de cáscara y el resto es arroz integral. La cáscara está compuesta por un 20% de sílice y un 9-20% de lignina que le otorgan protección física frente al ataque de insectos y hongos, hasta un 6% de cutina que cubre las capas externas de la cáscara, carbohidratos como celulosa, fibra cruda y hemicelulosa. No contiene almidón y el contenido de proteínas y lípidos es bajo. Además contiene, alcoholes, esteroides, compuestos fenólicos, vitaminas y minerales.⁽⁸³⁾

El arroz integral obtenido luego del pelado está formado por un 3% de salvado de arroz, 4% germen (que es lo que le otorga el color) y un 93% de endospermo. El interior del grano, de color blanco, es el arroz blanco.⁽⁸⁵⁾

El salvado de arroz es una excelente fuente de proteínas (12-15%) y lípidos (15-20%), además contiene celulosa y hemicelulosa y un alto contenido en vitaminas.

Además, tanto el arroz paddy como el integral poseen α -caroteno, luteína y licopeno, estos carotenoides no se encuentran presentes en el arroz blanco.⁽⁸⁵⁾

Una vez removidas las capas de salvado y el germen y luego del pulido, se obtiene el arroz blanco. Este está compuesto enteramente por el endospermo, con un contenido de hasta un 90% de almidón en base seca, hasta un 11% de proteínas y un bajo contenido de lípidos y fibra cruda (alrededor de 0,3-0,5%). Los principales minerales son el fósforo y el potasio y niacina, inositol, y colina las tres principales vitaminas. La **Tabla 9** muestra los principales componentes del arroz paddy (en porcentaje) y de los diferentes productos luego de su procesamiento.⁽⁸³⁾

Componente (%)	Arroz paddy	Arroz integral	Arroz blanco	Cáscara	Salvado (afrecho)
Carbohidratos	64-73	73-87	77-89	22-34	34-62
Proteína	5,8-7,7	4,3-18,2	4,5-10,5	2,0-2,8	11,3-14,9
Ceniza	2,9-5,2	1,0-1,5	0,3-0,8	13,2-21	6,6-9,9
Lípidos	1,5-2,3	1,6-2,8	0,3-0,5	0,3-0,8	15-19,7
Fibra cruda	7,2-10,4	0,6-1,0	0,2-0,5	34,5-45,9	7,0-11,4

Tabla 9. Composición química de los diferentes productos obtenidos durante el procesamiento del arroz. Porcentajes calculados en base a un 14% de humedad del grano.

4.3.8. Particularidades del cultivo

Las prácticas de cultivo varían según la región. En los países tropicales de Asia durante años, los campos de arroz se han cultivado todos los años al menos una vez al año, incluso, si el agua es suficiente se realizan dos cultivos anuales.⁽⁸⁰⁾ Esta práctica de cultivo ha dañado mucho los suelos, por lo que los rendimientos son bajos. En Japón, los campos de arroz se cultivan cada año con la particularidad de que se rota el sistema de fertilización y el manejo del agua es adecuado, lo que permite obtener buenos rendimientos en los cultivos. En países como España, Italia, y Portugal hasta los años 60 se aplicó el sistema de rotación de cultivos con pasturas, trébol o alfalfa, aplicando altas cargas de fertilizantes. Pero luego de la revolución industrial, se redujeron ampliamente los recursos humanos y por lo tanto se redujo la rotación de cultivos, imponiéndose el sistema de cultivo convencional.⁽⁴⁾ En EE.UU. el sistema de cultivo suele variar con el tipo de suelo y con las condiciones económicas que afectan la oferta y la demanda del arroz. En nuestro país como se comentó anteriormente se aplica un sistema de rotación con pasturas e integrado con la producción ganadera.⁽⁸⁰⁾

4.3.8.1. Preparación del terreno

El cultivo de arroz comienza con la preparación del terreno que va a ser sembrado, esta etapa se conoce como laboreo del suelo. El laboreo se realiza justo antes de la siembra con el fin de dejar el terreno lo suficientemente disgregado.⁽⁴⁷⁾

En los suelos arroceros de tierras húmedas o secas, el laboreo depende de la técnica de establecimiento del cultivo, de la humedad y de los recursos mecanizados. En los países de Asia tropical, la mayor parte del laboreo se realiza de forma manual. El método tradicional de labranza para el arroz de tierras bajas es el arado y la cementación, siendo este último muy importante, pues permite el fácil trasplante de la planta.

Los campos de arroz deben ser drenados cuando la plántula de arroz está emergiendo del suelo y nuevamente, cuando el cultivo está listo para ser

cosechado. Además se ha demostrado que la nivelación de la tierra es rentable, ya que la tierra nivelada es más fácil de drenar y regar.⁽⁸⁰⁾

En nuestro país, desde mediados del otoño en adelante se realizan las labores de arado y rastreado empleando tractores de alta potencia y rastras excéntricas pesadas. Estas labores tienen como objetivo que los equipos trabajen mejor en las condiciones del terreno (enero-febrero), para comenzar la siembra en fecha (octubre-noviembre) y lograr un riego y control de malezas más eficiente.⁽¹⁵⁾

4.3.8.2. Siembra

En Uruguay, el arroz se siembra en suelo seco, en líneas o al voleo como cualquier cereal.⁽¹⁵⁾ En la **Tabla 10** se recogen los distintos métodos de siembra utilizados según el tipo de cultivo del arroz, así como la correspondiente altura máxima del agua del arrozal.⁽⁴⁷⁾

La cantidad de semilla empleada debe dar lugar a un cierto número de tallos/m², después del ahijamiento, que sea el óptimo productivo para cada variedad y que produzcan espigas que maduren lo más uniformemente posible. El mayor número de tallos principales produce una mayor sensibilidad al encamado, pero asegura una maduración más homogénea de las espigas. En todo caso, es aconsejable aumentar la dosis de semilla, especialmente en siembras tempranas. La dosis media de siembra sería de 140-180 kg de semilla por ha.⁽⁸⁰⁾

En otras regiones del mundo se siembra arroz pre-germinado en el agua o incluso se trasplantan plantines de arroz. La mayoría de los problemas durante la siembra están asociados a la temperatura ambiente, ya que ésta debe estar por encima de los 10 °C para evitar la interrupción de la germinación y problemas en las cantidades de fertilizantes que pueden estimular el crecimiento de malezas.⁽⁴⁾

Tipos de cultivo del arroz	Método de siembra	Profundidad máxima del agua
Arroz de tierras bajas	Trasplante	0-50
Arroz superficial de tierras bajas	Trasplante	5-15
Arroz de profundidad media de tierras bajas	Trasplante	16-50
Arroz de aguas profundas	A voleo en suelo seco	51-100
Arroz flotante	A voleo en suelo seco	101-600
Arroz de tierras altas	A voleo o en hileras en suelo seco	Sin agua estancada

Tabla 10. Métodos de siembra según el tipo de cultivo del arroz y su correspondiente altura máxima del agua del cultivo de arroz.

4.3.8.3. Riego

Luego de la siembra del cultivo se construyen las taipas que son estructuras que permiten la retención del agua de riego sobre la superficie del suelo. El nivel del agua debe tener la altura correcta en relación con el desarrollo de la planta. En los primeros días el nivel de agua debe ser alto, para proteger del frío a la plántula, impedir el desarrollo de malezas y que las ráfagas de viento arranquen las plantas. Cuando el arroz está suficientemente desarrollado, entre los 35 y 50 días luego de la siembra, se coloca sobre el suelo una lámina de agua de aproximadamente 10 cm y se mantiene este volumen de agua desde diciembre hasta la cosecha en marzo. Los requerimientos de agua varían según el tipo de suelo. Suelos arcillosos o compactos requieren menor cantidad de agua que suelos francos o arenosos, debido a la rápida percolación del agua. Conviene renovar el agua para conseguir una óptima oxigenación y una temperatura adecuada.^(15,47)

4.3.8.4. Cosecha

El momento óptimo de recolección se produce cuando la panícula del arroz alcanza su madurez fisiológica (esto es, cuando el 95% de los granos tengan el color paja y el resto estén amarillentos) y la humedad del grano sea del 20 al

23%.⁽⁴⁷⁾ Además el suelo debe estar lo suficientemente seco y firme como para soportar las máquinas cosechadoras.

La madurez del arroz se prueba por la dureza del grano al diente, que debe ofrecer una resistencia suficiente para que impida cortarlo.⁽⁸⁰⁾

4.3.8.5. Secado y almacenamiento

Una vez cosechado el arroz contiene un alto porcentaje de humedad, por lo que es necesario reducir el contenido de agua hasta un 12-14% aproximadamente de forma de protegerlo contra la acción de hongos durante el tiempo de almacenamiento.⁽⁸⁰⁾ El secado se efectúa en secaderos térmicos estáticos o dinámicos que proveen aire calentado mediante la quema de combustible. Una vez finalizadas las operaciones de recolección, limpieza y secado de cada partida destinada a semilla, se llevan a cabo las determinaciones de calidad reglamentarias (impurezas, humedad, granos rojos, verdes y yesosos, germinación, etc.), eliminándose las que no reúnen condiciones requeridas. La selección mecánica tiene por objeto separar aquellos tipos de granos que no interesa conservar junto a la semilla seleccionada, mejorando la calidad de la misma. Esta operación se realiza mediante máquinas limpiadoras y seleccionadoras, que eliminan las materias indeseables (cascarilla, pajas, granos partidos, semillas de malas hierbas o de otros cereales, etc.).^(47,86)

4.3.9. Plagas y enfermedades

4.3.9.1. Malezas

La aparición de malezas en campos de arroz se debe en general, a semillas, rizomas, bulbos o tubérculos que sobrevivieron en el suelo de cultivos anteriores. Las malezas compiten con el arroz por los nutrientes, el agua, el espacio y la luz. Dicha competencia en el caso del cultivo del arroz varía con el tipo de cultivo, el método de siembra, la variedad y las técnicas de cultivo (preparación del terreno, densidad de siembra, abonado, etc.) y resulta más

importante en las primeras fases de crecimiento del cultivo; por tanto, su control temprano resulta esencial para obtener óptimos rendimientos.^(47,87)

Los suelos inundados favorecen la abundancia de semillas viables de malezas en el arrozal, dando lugar a una flora adventicia específica, de hábito acuático, que requiere métodos adecuados de control.⁽⁴⁷⁾

Además las malezas sirven de huésped a insectos, intensificando los problemas generados. Según el IRRI las malezas producen una disminución del 34% en arroz trasplantado, un 45% en arroz de siembra directa y de secano y un 67% en arroz de “tierras altas”.⁽⁸⁸⁾

Las malezas se pueden clasificar en hierbas, malezas de hoja ancha y juncias. La **Tabla 11** muestra algunos ejemplos de las malezas más comunes encontradas en cultivos de arroz de zonas tropicales.^(47,88,89)

Clasificación de maleza	Especie	Tipo de cultivo
Hierba	<i>Echinochloa glabrescens</i>	Arroz de tierras bajas
	<i>Echinochloa crus-galli</i> ssp.	
	<i>Paspalum distichum</i> L.	
	<i>Echinochloa colona</i> (L.)	Arroz de tierras altas
	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.)	
	<i>Dacryloctenium aegyptium</i> (L.)	
	<i>Paspalum dilatatum</i>	
	<i>Rottboellia exaltata</i>	
	<i>Imperata cylindrica</i>	
Maleza de hoja ancha	<i>Monochoria vaginalis</i>	Arroz de tierras bajas
	<i>Sphenoclea zeylanica</i>	
	<i>Ageratum conyzoides</i> L.	
	<i>Trianthema portulacastrum</i> L.	Arroz de tierras altas
	<i>Portulaca oleracea</i> L.	
	<i>Ipomoea triloba</i> L.	
	<i>Eclipta alba</i> (L.)	
	<i>Commelina diffusa</i>	
	<i>Commelina benghalensis</i> L.	
	<i>Celosia argentea</i> L.	
	<i>Calopogonium mucunoides</i>	

	<i>Amaranthus spinosus</i> L.	
	<i>Cyperus difformis</i> L.	
	<i>Fimbristylis littoralis</i>	
Juncias	<i>Cyperus iria</i> L.	Arroz de tierras bajas
	<i>Scirpus maritimus</i> L.	
	<i>Cyperus iria</i> L.	
	<i>Cyperus rotundus</i> L.	

Tabla 11. Malezas más comunes encontradas en cultivos de arroz en zonas tropicales.

La manera más eficaz para el control de malezas en cultivos de arroz es mediante la combinación de prácticas manuales, mecánicas y químicas. Entre los métodos agronómicos para el control de malezas destacan el laboreo (profundidad y época de realización), riego (control de la capa de agua de inundación según la fase de cultivo), rotaciones y siembra (época, tipo y densidad). La determinación del límite de profundidad del agua es muy importante para maximizar la eliminación de malezas, ya que, por ejemplo, el incremento de la profundidad del agua aumenta la eficacia en el control de ciertas especies como *Echinochloa oryzoides* y *Cyperus difformis*.⁽⁴⁷⁾

Echinochloa spp. es una de las malezas más importante en el cultivo de arroz, pudiendo afectar considerablemente al rendimiento. Su emergencia es escalonada, precisando de tratamientos repetidos por la escasa persistencia de los productos que la controlan. Los tratamientos se realizan en pre y post-emergencia temprana, antes de la nacencia de esta maleza; los tratamientos se pueden realizar en seco, 1-2 días antes de la inundación para efectuar la siembra, o bien después de ésta con el campo ya inundado.^(47,88,89)

Sin duda alguna, una de las mayores dificultades en la producción de arroz de siembra directa lo constituye la incidencia del arroz rojo (*Oryza sativa* L. var. *sylvatica*), el cual se halla diseminado en todo el mundo. Esta maleza es una de las especies principales en el arroz de siembra directa en el Mediterráneo mientras que su presencia en EE.UU, América Latina y el Caribe obstaculiza el proceso de cosecha y reduce la calidad de la producción obtenida.⁽⁹⁰⁾

Las principales características del arroz rojo son:

- El color rojo de su pericarpio, que lo confiere un gen dominante presente en el pericarpio.

- Suele desgranarse más tempranamente que su homólogo y sus semillas poseen latencia.

- Su presencia en los granos cosechados reduce la calidad de la producción y provoca una reducción de su precio.

No todas las formas de arroz maleza tienen el pericarpio rojo, pero si crecen más rápido que su similar cultivable y se desgranar tempranamente.⁽⁹⁰⁾

Las pérdidas de la cosecha debidas a la incidencia del arroz rojo pueden ser de hasta 60% en condiciones de alta infestación en campo. Muchos países de América latina autorizan la presencia de arroz rojo en algunas clases de arroz comercial, pero en nuestro país el arroz rojo no está permitido en ninguna clase de arroz y de hecho esta maleza está prácticamente erradicada. Existen algunos métodos para evitar la ocurrencia de arroz rojo, tales como sembrar semillas pre-germinadas o la rotación de cultivos.

El control de arroz rojo es muy difícil ya que ambos pertenecen a la misma especie y por lo tanto comparten prácticamente las mismas características morfológicas y fisiológicas. Por esta razón el control químico con herbicidas selectivos hasta el momento ha sido imposible. Además la separación por métodos mecánicos o manual de las semillas de arroz rojo es complicada y poco práctica ya que en las primeras etapas de crecimiento es muy difícil de distinguir entre el arroz rojo y el arroz doméstico.⁽⁹¹⁾

Por otro lado el arroz salvaje *Oryza barthi* y *O. longistaminata* se hallan entre las cuatro especies más importantes de malezas en África Occidental y el Sahel.

4.3.9.2. Enfermedades

Las enfermedades del arroz pueden ser producidas por hongos, bacterias, virus y nematodos. La aparición de enfermedades en zonas templadas o tropicales está influenciada principalmente por factores climáticos y por las prácticas del cultivo. En las enfermedades causadas por hongos generalmente

se observan manchas localizadas en las hojas, los tallos y las vainas de las hojas.

Las enfermedades producidas por bacterias son sistémicas y en general impiden el crecimiento de las plántulas o se observan lesiones en los márgenes de las hojas.

Mientras que los virus también provocan efectos sistémicos, caracterizados por crecimiento anormal o cambios de color de la hoja.

4.3.9.2.1. Enfermedades producidas por hongos

A continuación se describen las principales enfermedades descritas en cultivos de arroz:

-*Pyricularia oryzae*: esta enfermedad se da a nivel mundial, mayormente en América Latina y oeste de África que es donde se da el mayor porcentaje de arroz de “tierras altas”. Es causada por un hongo microscópico. El micelio del hongo produce una sustancia tóxica conocida como piricularina, que inhibe el crecimiento de los tejidos y los desorganiza.⁽⁴⁷⁾

-*Rhizoctonia solani*: esta enfermedad está considerada como la segunda en importancia económica después de la *Pyricularia*. Se da principalmente en el trópico, ya que las altas temperaturas y humedad favorecen su crecimiento. La humedad está muy influenciada por la densidad de siembra; por lo tanto, una alta densidad de siembra junto a elevadas dosis de aplicación de fertilizantes, tienden a incrementar el efecto de esta enfermedad.

-*Helminthosporium oryzae*: es una enfermedad que ataca a la planta de arroz en todas sus etapas de crecimiento. Su severidad está frecuentemente relacionada con suelos deficientes en nitrógeno o suelos salinos y con una nutrición deficiente, principalmente en potasio.

-*Fusarium moliniiforme*: El principal síntoma que se observa es una elongación de las plántulas que son delgadas y de color amarillento a verde. En los cultivos maduros, las hojas de las plantas infectadas se secan y finalmente mueren. Si sobreviven a la cosecha, las panículas están vacías. Puede observarse un polvo blanquecino dentro de la vaina y en la panícula.^(47,88,92)

-*Sarocladium oryzae*: Las lesiones comienzan en la vaina de la hoja observándose manchas alargadas o irregulares, con márgenes de color marrón y centro gris o marrón gris en todas partes. Las manchas se agrandan y se unen cubriendo la mayor parte de la vaina de la hoja. En las vainas de hojas afectadas se puede observar un abundante micelio en forma de polvo blanquecino. El patógeno infecta a las plantas de arroz en todas las etapas de crecimiento, pero es más destructivo después de la etapa de arranque. Los campos densamente plantados y los infestados por los barrenadores del tallo son susceptibles a la infección por *S. oryzae*.^(47,88,92)

4.3.9.2.2. Enfermedades producidas por bacterias

Las enfermedades causadas por bacterias se han registrado principalmente en la mayoría de los países tropicales de Asia. Las principales bacterias son *Xanthomonas translucens* y *Xanthomonas oryzae*.⁽⁸⁰⁾

4.3.9.2.3. Enfermedades producidas por virus

En general los virus son transmitidos por insectos, la mayoría de ellos muy específicos, como el insecto *Tagosodes orizicolus* que transfiere el virus llamado hoja blanca, que ha causado grandes pérdidas en América del Sur y Central, en países tales como Colombia, Cuba y Venezuela.

Otra de las enfermedades más destructivas del arroz se denomina Tungro, cuyos síntomas se manifiestan en el color de las hojas pasando a naranja o amarillo. Dicha enfermedad está causada por un complejo vírico formado por el virus esférico (RTSV, de las siglas en inglés; Rice Tungro Spherical Virus) y el virus baciforme (RTBV, de las siglas en inglés; Rice Tungro Bacilliform Virus). Este complejo vírico es transmitido por varias especies, por ejemplo el *Nephotettix virescens*. El incremento de esta enfermedad está asociado con el incremento de la población del vector.^(47,88)

4.3.9.2.4. Enfermedades producidas por nematodos

Las enfermedades producidas por nematodos han sido reportadas principalmente en India y Bangladesh. Los nematodos más comunes son *Hirschmaniella oryzae*, *Ditylenchus angustus* y *Aphelenchoides besseyi*. Durante la maduración del grano, los nemátodos entran en estado de anaerobiosis, pudiendo sobrevivir en los granos, incluso hasta más de tres años.⁽⁴⁷⁾

4.3.9.3. Insectos

La planta de arroz es susceptible al ataque de más de 100 especies de insectos, pero solo 20 pueden ocasionar daños importantes. Estas especies pueden afectar todas las partes de la planta en las diversas etapas de crecimiento. Las principales plagas que ocasionan pérdidas económicas pertenecen al orden lepidóptero, coleóptero, díptero, hemíptero, que no solo producen un daño directo sino también transmiten enfermedades virales. El ecosistema del arroz tiene algunas plagas primarias que bajo ciertas condiciones limitan la producción.

En Uruguay, salvo en la zona litoral norte, en general no existen problemas serios con insectos gracias a una importante presencia de predadores en el ambiente del arrozal. El equilibrio existente entre las poblaciones naturales asegura un ambiente “libre” de insectos dañinos en el cultivo.⁽⁹³⁾ Por lo que en términos generales las plagas distan mucho de ocupar una posición relevante en el manejo general del cultivo. Previo a la irrigación por inundación de los cultivos pueden ser dañados por un conjunto de organismos que destruyen las plántulas y pequeñas plantas. En los últimos años la *Euetheola humilis* ha causado importantes daños en los cultivos tanto previo a la irrigación como en pre-cosecha. En los cultivos inundados, *Oryzophagus oryzae* es la plaga más recurrente, que produce daños en las raíces. Incluso las chinches llegan a afectar la calidad de los granos y reducen la producción.^(94,95)

La **Tabla 12** muestra las principales plagas en Uruguay y los correspondientes daños producidos.

Daños en la implantación	Especie
-Falta de plántulas, plantas cortadas, o dañadas, hojas devoradas -Tallos dañados a nivel del suelo, plantas caídas o marchitas -Tallo dañados, taladrados por debajo del cuello, junto a un tubo de seda subterráneo cubierto con partículas de suelo -Hojas cubiertas con pequeñas manchas blancas alargadas -Colonias de pulgones en la base de los tallos y en raíces	<i>Agrotis ipsylon</i>, <i>Peridroma saucia</i>, <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Eutheola humilis</i> <i>Elasmopalpus lignosellus</i> <i>Collaria scenica</i> <i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i>
Daños en el periodo vegetativo-reproductivo	
Hojas -Hojas roídas o con pequeñas perforaciones -Hojas comidas de manera irregular, defoliaciones de distinta intensidad	<i>Diatraea saccharalis</i>, <i>Faronta albilinea</i>, <i>Lissorhoptrus spp</i>, <i>Pseudaletia adultera</i>, <i>Oryzophagus oryzae</i> <i>Faronta albilinea</i>, <i>Pseudaletia adultera</i>
Tallos -Tallo central seco con un estrangulamiento de color oscuro que impide la circulación de nutrientes -Tallos barrenados y secos, panículas muertas. -Tallos dañados en la base, plantas debilitadas, plantas caídas	<i>Tribaca limbativentris</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Eutheola humilis</i>

Espiga	
-Panojas o espigas marchitas o muertas, espigas blancas	<i>Tribaca limbativentris</i>
-Granos dañados, generalmente deformes, o manchados	<i>Oebalus spp</i>
Raíces	
-Sistema radicular dañado, anclaje de las plantas deficiente, plantas marchitas, o con crecimiento retardado	<i>Lissorhoptus spp., Oryzophagus oryzae</i>

Tabla 12. Principales plagas en Uruguay con los correspondientes daños producidos.

Diatraea saccharalis: comúnmente llamado barrenador de la caña de azúcar, es una especie americana con una vasta distribución en el continente americano; EE.UU., México, Colombia, Perú, Bolivia, Paraguay, Argentina, Brasil, muy común y extendida en todo el territorio uruguayo. Es la principal plaga de la caña de azúcar en la zona de Bella Unión. En cultivos de arroz, trigo y maíz su importancia es menor aunque en este último puede ocasionar daños de cierta entidad. Las larvas penetran en los tallos de las gramíneas donde realizan galerías longitudinales en su interior, lo que reduce el crecimiento y debilita a la planta. En arroz, cuando las plantas son nuevas, las larvas provocan la muerte del cogollo. Si se trata de plantas desarrolladas los tallos se secan y las espigas toman color blanquecino. Al igual que en el caso del maíz las larvas se alimentan de los granos.^(94,95)

Faronta albilinea: vulgarmente llamada lagarta de las espigas de los cereales, se distribuye principalmente en la zona del cono sur de América del Sur. Habita preferentemente en diversas gramíneas, tanto cultivadas como silvestres, provocando perjuicios de poca magnitud. Las primeras manifestaciones en cereales se observan en las hojas que aparecen roídas en diversas partes de la lámina, mientras que las nervaduras y epidermis de la cara opuesta donde ocurrió la alimentación permanecen intactas.^(94,95)

Pseudaletia adultera: llamada lagarta de los cereales o lagarta militar, se distribuye principalmente en el sur de Brasil, norte argentino y Uruguay. Es un

insecto polífago cuyas preferencias alimenticias están dirigidas hacia las gramíneas cultivadas: trigo, avena, cebada, centeno, arroz, maíz. Sus ataques son frecuentes y además las gramíneas que ataca ocupan un área importante de la región agrícola-ganadera. ^(94,95)

Oryzophagus oryzae, llamado gorgojo acuático del arroz. Se encuentra principalmente en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay. En nuestro país este insecto se registra en todas las zonas productivas, aunque con diferentes grados de incidencia. Los daños más importantes se dan en las raíces, ya que los adultos se alimentan de éstas. ^(94,95)

Agrotis ipsilon: lagarta cortadora. Su distribución es cosmopolita. Es una plaga con características erráticas que hace que la intensidad de sus daños varíe de una temporada a otra. Los ataques mayores ocurren durante la primavera. A menudo provoca serios daños por lo que requiere de estrictas medidas de control. ^(94,95)

4.3.10. Usos de agroquímicos en cultivos de arroz

Ante la búsqueda constante de un aumento de la productividad y maximización de las ganancias, la agricultura utiliza una alta carga de agroquímicos. El cultivo de arroz no escapa a esta problemática, fundamentalmente en lo que respecta al uso de herbicidas, los cuales en nuestro país, se aplican en el 96% del área sembrada. La aplicación de fitosanitarios, en el sistema de rotación, se realiza en la etapa de cultivo y disminuye en la etapa de pasturas. Por tanto la intensidad de aplicación de agroquímicos, por año es menor en sistemas que realizan rotación de cultivos con pasturas. ⁽⁹⁶⁾

La selección del método de control de plagas normalmente se realiza en base a tres criterios; 1)- aquellos pesticidas permitidos para uso en determinado cultivo, 2)- el tipo de plaga que se quiere combatir y 3)- la estimación de eficiencia, costo e impacto ambiental.

Teniendo en cuenta la producción sustentable y los altos niveles de competitividad que se requieren en la agricultura, al momento de elección del método a emplear para el manejo de plagas, en general se impone el factor económico al ambiental.

De todas maneras, los pesticidas utilizados en cada país varían según el sistema de cultivo, el clima y las prácticas realizadas por los agricultores, pero en general se basa en un gran uso de herbicidas para controlar malezas, seguido por fungicidas e insecticidas. Se estima que, sin un adecuado control de malezas las pérdidas de este cultivo pueden llegar a ser del 90%.⁽⁴⁾ En cultivos de arroz, el control de malezas se establece según el grado de infección y las condiciones de siembra. El uso de herbicidas varía considerablemente en diferentes países; por ejemplo en cultivos de arroz en Japón se realizan más de 2 aplicaciones de herbicidas, mientras que en Filipinas solo la mitad del área sembrada es tratada y en Bangladesh donde las labores rurales son baratas, los herbicidas se usan en baja cantidad, eliminando las malezas de forma manual.^(97,98)

Actualmente existe la tendencia de minimizar el uso de insecticidas para evitar la resistencia. Pero, en áreas tropicales, el control de insectos de arroz todavía depende del uso de insecticidas sistémicos y de contacto.⁽⁸⁸⁾

El tratamiento con fungicidas puede realizarse en la semilla para reducir la incidencia de enfermedades provocadas por hongos o durante el almacenamiento de los granos una vez cosechados.⁽⁴⁾ Las estrobilurinas, el tricyclazole, isoprothion, tebuconazole y prochloraz son los fungicidas más utilizados para el control del hongo *Magnaporthe oryzae*. En los últimos años se ha intentado desarrollar variedades de arroz resistentes a patógenos de forma de disminuir el uso de productos fitosanitarios.⁽⁴⁾

Durante el almacenamiento del grano, fenitrothion, malathion y deltamethrin son utilizados para el tratamiento de los silos de almacenamiento. La lista completa de los pesticidas autorizados para uso en cultivos de arroz en cada país sería muy útil, pero desafortunadamente no existe.

En Uruguay se utiliza aproximadamente un 96% de herbicidas y un 67% de fungicidas. El único herbicida que se aplica a nivel mundial en cereales y en gran cantidad es el glifosato.⁽⁸⁵⁾

La **Tabla 13** muestra un resumen de los herbicidas, insecticidas y fungicidas más usados con su correspondiente tasa de aplicación reportadas en diferentes países incluyendo a Uruguay en donde se cultiva arroz.

Insecticida	T.aplic./ha	Fungicida	T.aplic./ha	Herbicida	T. aplic./ha
Carbofurán 2,4,7	10-20 kg	Hexaconazol 2,4	-	Bensulfurón-metil 1-6	0,08-0,1 kg
Etopenprox 3,4	4 L	Kresoxim-metil 5	1-1,25 kg	Bentazone 87% 1,2,3,6	1-2 kg
Fenitrotión 2,3,4	0,1-0,2 L/ton grano	Trifloxistrobín 2,4,7	0,5-0,8 L	Bispiribac sodio 1,2,3,4,6	0,02 kg
Pirimifós-metil 4,7	0,08 L/ton grano	Carbendazím 2,3,7	-	Cihalofop-butil 2, 3,4,5,6	0,2-0,3 kg
Metiocarb 4,5	6 kg/ton semilla	Tebuconazol 2,3,4,7	0,45-1 kg	Clomazone 1-7	0,4 kg
Diazinón 2,5	0,75 L	Triciclazol 2,3,4	0,3-0,4 kg	Glifosato 1-6	0,5-4 kg
Clorpirifós 2,5	0,06-0,15 L	Procloraz 3,4	0,5 L	Molinato 1-6	2-4 kg
Triclorfón 3,5,7	0,6-0,85 L	Tiofanato-metil 4	0,7-1 L	Pretilaclor 2,4,6	0,6 kg
Teflubenzurón 4	0,07 L	Isoprotiolane 2,3,4	1-1,5 L	Propanil 1,2,4,5,6	3-4 kg
Malatión 97% 3,7	1-2 L	Carbaril 2,3	1,2 kg	Profoxidím 5,6	0,1 kg
Fipronil 5,7	25 mL	Propiconazol 2,3,4,7	0,5-0,7 L	Quinclorac 2,4,5,6	0,5-0,6 kg
Cipermetrina 5,7	100 mL	Triflumizol 30% ³	0,15 kg	Metsulfurón-metil 4,6	0,002 kg
				Penoxulám 4,6	0,04 kg
				Tiobencarb 1-7	2-3 kg
				Azimsulfurón 3,6	0,04-0,05 kg

Tabla 13. Ejemplos de pesticidas utilizados en cultivos de arroz en ¹EE.UU., ²Asia, ³España, ⁴Uruguay, ⁵Australia, ⁶Italia y ⁷Brasil con las correspondientes tasas de aplicación. ^(47,88,100,101,102)

4.3.10.1. Efecto de los agroquímicos durante el procesamiento del arroz

Algunos reportes muestran que en la mayoría de los alimentos, una parte de los pesticidas se pierde durante el procesamiento.⁽⁸⁵⁾ En el caso del tratamiento post-cosecha de los cereales la tendencia a la disminución en la concentración de los pesticidas es más lenta.⁽¹⁰²⁾

El estudio del destino de los residuos de pesticidas durante el procesado de un alimento o su cocción es importante para estimar la ingesta en una dieta, para

establecer LMRs y conocer los niveles reales de un pesticida en un alimento elaborado.⁽¹⁰³⁾ En general la concentración de los pesticidas se determina en productos básicos (materias primas), por lo que para evitar una sobreestimación de la ingesta de pesticidas es necesario considerar ciertos factores de procesamiento. En particular para el arroz, los cambios en la concentración de residuos de pesticidas ocurren durante las etapas de descascarado, molienda, cocción, lavado y eventualmente en la etapa de tratamiento con vapor en la producción del arroz parboiled, pero existen muy pocos reportes en la literatura acerca de la distribución de los pesticidas durante el procesamiento.

Kaushik et al, estudiaron el efecto de la etapa de vaporización para producir el arroz parboiled en la concentración de diferentes pesticidas. Los resultados mostraron una reducción significativa dependiendo del pesticida por lo que concluyeron que esta reducción se debía a la inactivación o degradación de los pesticidas durante el procesado del arroz para la obtención del arroz vaporizado. Además estos autores estudiaron 2 insecticidas; malatión y clorpirifós en arroz con cáscara, en cáscara, arroz integral, arroz blanco y en arroz cocido, resultando que el proceso de parboilización reduce los residuos en arroz con cáscara y cáscara pero tiende a aumentar los residuos en el resto de las fracciones.⁽¹⁰⁴⁾

Chen et al, reportaron el uso de un factor de procesamiento de 0,27, que es el que generalmente se aplica para los efectos del lavado y cocinado.⁽¹⁰³⁾ Por otro lado la Junta de la FAO/WHO encargada de residuos de pesticidas (JMPR), en el año 2003, evaluó los factores de procesamiento para fenitrotión, en diferentes “commodities” del arroz. El fenitrotión es utilizado en ocasiones para tratamiento post-cosecha. Para este estudio se almacenó arroz paddy durante 1 año, luego de un tratamiento post-cosecha con 15 g/ton de fenitrotión, fue procesado para obtener arroz descascarado, arroz blanco y salvado. El arroz blanco y descascarado se cocinaron durante 25 minutos y posteriormente el fenitrotión fue analizado en todos los productos. En base a los resultados obtenidos se calculó el factor de procesamiento.⁽¹⁰⁵⁾ Algunos ejemplos de factores de procesamiento se presentan en la **Tabla 14**.^(106,107)

Pesticida	Producto procesado	FP	n
Azoxistrobín	Arroz blanco	0,09	1
Benomilo	Arroz blanco	0,01	1
Carbaril	Arroz blanco	0,02	2
Carbofurán	Arroz integral	0,25	1
Clorpirifós	Arroz integral, Arroz blanco	0,13; 0,07	2, 4
Deltametrina	Arroz integral, Arroz blanco	0,15; < 0,06	1
Fenitrotión	Arroz integral, Arroz integral cocido	0,64,; 0,11	22, 1
Fenitrotión	Arroz blanco	0,15	26
Fenitrotión	Arroz blanco lavado	0,046	3
Fenitrotión	Arroz blanco cocido	0,04	1
Fenitrotión	Arroz blanco lavado y cocido	0,02	9
Flutolanil	Arroz integral, Arroz blanco	0,32; < 0,16	1
λ-cihalotrina	Arroz blanco	< 0,01	1
Malatión	Arroz blanco	0,02	1
Espinosad	Arroz integral, Arroz blanco	0,11; 0,022	2
Trifloxistrobín	Arroz blanco	0,18	4

Tabla 14. Factores de Procesamiento promedios, reportados en arroz.
FP: Factor de Procesamiento, n: número de países que participaron en los ensayos para la estimación del FP.

4.3.11. Legislación sobre Pesticidas en Alimentos

Para evitar un impacto en la salud pública y seguir las BPA, se han establecido Límites Máximos de Residuo (LMR) para pesticidas en alimentos y agua potable en la mayoría de los países.⁽²⁹⁾

Se entiende por LMR, la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg) presente en la superficie o la parte interna de productos alimenticios, recomendada por la Comisión del *Codex Alimentarius*, para que se permita legalmente su uso para consumo humano y animal.

Los LMRs legalmente son la concentración máxima aceptable para residuos de pesticidas que cumplen con las BPA y que aseguran la mínima exposición posible al consumidor.⁽¹⁰⁸⁾

Además para proteger al consumidor, los LMR se fijan a una concentración lo suficientemente baja como para que si ese producto es utilizado en una cantidad mayor a la recomendada en las BPA resultará en un valor por encima del LMR. El valor propuesto siempre es un compromiso entre el nivel de

producto utilizado y el hecho de que el LMR no produzca un mal uso. Actualmente los residuos de plaguicidas se encuentran regulados por diferentes organismos en todo el mundo. La UE, a través de la Directiva 1107/2009/CE ha armonizado los LMR para todos los alimentos destinados al consumo animal o humano.⁽²⁵⁾

Esta regulación además de reunir y armonizar los límites que se aplican a los diferentes productos, para consumo humano y animal, también establece, un límite máximo de 10 µg/kg aplicable por defecto para aquellos productos y/o pesticidas en los que no se ha establecido un LMR.

El *Codex Alimentarius* también establece LMRs, que se aplican principalmente a productos que circulan en el comercio internacional. Estos se obtienen basándose en estimaciones hechas por la JMPR, después de: a) la evaluación toxicológica del plaguicida y su residuo; y b) el examen de datos de residuos obtenidos en ensayos y usos supervisados, en particular usos que se ajustan a las BPA nacionales. En el examen se incluyen datos de ensayos supervisados realizados a la concentración de uso más elevada recomendada, autorizada o registrada en el país. Para tener en cuenta las variaciones introducidas en los requisitos nacionales de control de plagas, en los LMR del *Codex* se consideran los niveles más elevados observados en tales ensayos supervisados, que se estima representan las prácticas efectivas de control de plagas.^(109,110)

El examen de las diversas estimaciones y determinaciones, tanto a nivel nacional como internacional, de las ingestas de residuos a través de la alimentación, teniendo en cuenta la Ingesta Diaria Admitida (IDA), debería indicar que los alimentos que se ajustan a los LMR del *Codex* son inocuos para el consumo humano.^(109,110) Nuestro país según el decreto 285/009 adopta los LMR del *Codex*. Aunque al momento de la exportación debe seguir las legislaciones correspondientes al país de destino.⁽¹¹¹⁾

En la **Tabla 15** se encuentran los LMRs establecidos por algunos de los países productores de arroz, por el *Codex* y por la UE para algunos de los pesticidas utilizados en cultivos de arroz. Es importante destacar que para arroz blanco el *Codex* sólo establece los LMR para carbaril, flutolanil, dicuat y clordano y para arroz con cáscara están establecidos los LMR para diflubenzurón, tiacloprid,

fipronil, dicuat, trifloxistrobín, azoxistrobín, cipermetrinas, cihalotrin, clorpirifós, clorpirifós-metil, paracuat y bentazone, mientras que la UE y otros países han incorporado un mayor número de LMRs en arroz.

Como se puede observar en la **Tabla 15**, la legislación varía en función del país, no solo en los pesticidas autorizados sino también en los LMR usados. El carbaril, por ejemplo, tiene un LMR de 15 mg/kg en EE.UU., en Taiwán es 30 veces menos y en la UE está prohibido, a pesar de que igual existe un LMR de 1 mg/kg establecido a los efectos de regular las importaciones y exportaciones que se realicen en toda la UE. Del mismo modo que el carbaril, existen muchos otros pesticidas que no están autorizados en la UE pero que son muy utilizados en otros países. Otro ejemplo es el bispiribac sodio que la UE todavía no ha fijado un LMR, y por lo tanto se aplica un LMR por defecto de 0,01 mg/kg. Otro caso, es el del pirazosulfurón-etil, que ni siquiera está registrado en la UE, pero países como Corea y Taiwán si han establecido su LMR en arroz.⁽¹¹²⁾

Pesticida	EE.UU.	Codex	UE	Brasil	Corea	Taiwán
2,4-D	0,5	0,1	0,05	0,2	0,05	---
Azimsulfurón	---	---	0,02	---	0,1	---
Azoxistrobín	5	5	5	0,1	1,0	---
Bendiocarb	---	---	---	---	0,02	0,2
Bensulfurón-metil	0,02	---	---	---	0,02	0,5
Bentazone	0,05	0,1	0,1	0,02	0,05	0,5
Bispiribac sodio	0,02	---	---	0,01	0,1	---
Carbaril	15	1	1	---	1,0	0,5
Carbendazím	---	---	0,01	---	0,1	0,5
Carbofurán	---	---	0,02	---	0,2	0,5
Clorotalonil	---	---	0,01	---	0,2	---
Clorpirifós-metil	6	0,1	3	---	0,1	---
Clomazone	0,02	---	0,01	0,1	0,1	---
Cihalofop-butil	---	---	0,02	---	0,05	0,1
Diazinón	---	---	0,02	---	0,1	0,1
Difenoconazol	---	---	0,05	---	0,2	0,5
Diiflubenzurón	0,02	0,01	0,05	0,1	---	---
Epoxiconazol	---	---	0,1	---	---	0,5
Etofenprox	---	---	0,5	---	0,5	0,5
Fipronil	0,04	0,01	---	0,01	0,01	0,01
Flutolanil	7	1	2	---	1,0	1,0
Hexaconazol	---	---	0,02	---	0,3	0,1
Imazetapir	0,3	---	---	0,05	---	---
Imazosulfurón	---	---	0,01	---	0,1	---
Imidacloprid	---	---	0,05	---	0,05	0,5

Iprodiona	10	10	3,0	---	3,0	3,0
Isoprothiolane	---	---	---	---	0,5	0,5
λ -cihalotrina	1	1	0,02	0,05	---	0,5
Malatión	8	---	8	8	0,3	0,1
Molinate	---	---	0,05	---	0,05	0,1
Penoxsulám	0,02	---	0,01	0,01	0,1	0,02
Pirimicarb	---	---	0,2	---	0,05	---
Pirimifós-metil	---	---	5	---	1,0	1,0
Procloraz	---	---	1	---	0,05	0,5
Propanil	10	---	0,2	2	0,2	0,1
Propiconazol	7	---	0,05	0,1	0,1	1,0
Propoxur	---	---	0,05	---	0,1	0,1
Pirazosulfurón-etil	---	---	---	---	0,05	0,5
Piretrinas	3	0,3	3	---	3	---
Piridafentión	---	---	---	---	0,2	0,5
Quinclorac	5	---	5	0,05	0,05	1,0
Tebuconazol	---	---	2	---	0,005	0,05
Tebufozide	---	---	0,2	---	0,3	0,1
Terbufós	---	---	0,01	---	0,005	---
Tiacloprid	---	---	0,05	---	0,1	---
Tiametoxam	0,02	---	0,05	0,02	0,1	0,1
Tiobencarb	0,2	---	0,1	0,05	0,2	0,5
Triciclazol	---	---	1	---	0,7	0,5
Trifloxistrobín	3,5	5	0,02	0,2	---	---

Tabla 15. Comparación de LMRs en arroz establecidos por el *Codex Alimentarius*, Brasil, EE.UU., Taiwán, Corea y la UE.

4.3.12. Ocurrencia de Pesticidas en Arroz a Nivel Mundial

Según la base de datos www.pesticides-online.com, en la última década se han reportado varios casos de muestras de arroz conteniendo residuos de pesticidas. El origen de estas muestras fue principalmente Alemania, India e Italia. En la UE, de 2750 análisis de residuos de pesticidas en diferentes productos del arroz sólo el 6% fueron positivas y de este 6% sólo 20 análisis contenían concentraciones de pesticidas por encima del LMR. Los pesticidas que más frecuentemente excedieron dicho límite fueron triciclazol y quinclorac.⁽¹¹³⁾ Residuos de otros pesticidas tales como azoxistrobín, pirimifós-metil, carbendazím, clorpirifós, clorpirifós-metil e iprodiona fueron encontrados en algunos productos derivados del arroz, como se muestra en la **Tabla 16**.

Pesticida	Tipo de matriz	Nº muestras	Concentración (mg/kg)	Referencia
Azoxistrobín	Arroz	5	0,02-0,05	(113)
Buprofezín	Arroz paddy	5	0,07-2,5	(114)
Carbendazím	Arroz; arroz parboiled	8; 3	0,002-0,02; 0,015-0,02	(113)
Clorpirifós	Arroz paddy; Arroz	2; 45	0,10-2,2; 0,001-0,02	(103,113,114)
Cihalotrina	Arroz paddy	1	0,11	(114)
Deltametrina	Arroz	5	0,02-2,1	(113)
Diazinón	Arroz	4	0,11-0,58	(113,114,115)
Edifenfos	Arroz paddy	4	2,1-6,1	(118)
Fenobucarb	Arroz; arroz cocido	10; 2; 1	0,06-2,7; 0,65-0,86; 0,03	(114,115,116,117)
Flutolanil	Arroz	3	0,003-0,01	(113)
Hexaconazol	Arroz paddy; Arroz	24, 2	0,05-2,7; 0,003-0,008	(113,114)
Iprodiona	Arroz, arroz parboiled	3; 1	0,02; 0,009	(113)
Isoprotiolane	Arroz paddy; Arroz	16; 1	0,11-7,4; 0,31	(10,115)
Malatión	Arroz	25	0,008-0,12	(113)
Metamidofós	Arroz	86	0,0146*	(103)
Metoxiclor	Arroz	11	0,017-n.s	(113)
Ometoato	Arroz	14	0,0055*	(103)
Propiconazol	Arroz	3	0,003-0,014	(113)
Quinclorac	Arroz; arroz parboiled	8; 1	0,002-0,03; 0,03	(113)
Tebuconazol	Arroz	1	0,003	(113)
Tebufenozide	Arroz	117	0,073*	(113,103)
Triazofós	Arroz; arroz parboiled; arroz cocido	6; 1; 14	0,005-0,1; 0,002; 0,02-0,09	(113,118)

Tabla 16. Niveles de residuos de pesticidas detectados en arroz, en el periodo 2000-2010.* Promedio de la concentración encontrada en el total de muestras analizado.

En arroz con cáscara los pesticidas más frecuentemente encontrados fueron: buprofezín, clorpirifós, edifenfos, EPN, fenobucarb, iprobenfos, isoprotilane y hexaconazol. Esto es de esperar ya que su K_{ow} es alto, por lo que tienden a concentrarse en la cáscara, excepto el fenobucarb.^(113,116) En arroz blanco el malatión, triazofós, clorpirifós, metamidofós, pirimifós-metil, carbendazím, iprodiona, tebuconazol, quinclorac y triciclazol fueron los más frecuentemente encontrados incluso luego del procesamiento, como es el caso del triciclazol que se detectó no solo en arroz blanco sino también en arroz parboiled y cocido.^(103,115,118)

Como se puede observar en la **Tabla 16**, algunos pesticidas se encontraron presentes a concentraciones mayores al LMR, inclusive, algunos de los pesticidas listados (ej., buprofezín, diazinón, edifenfos, fenobucarb, metoxiclor, quinclorac y triciclazol) se encuentran prohibidos en la UE⁽¹¹⁹⁾, y otros como el carbendazím y el clorpirifós están prohibidos para su uso en arroz en Uruguay.⁽¹¹⁾

5. Análisis de Residuos de Pesticidas

Los pesticidas pueden encontrarse en los alimentos y en el ambiente a nivel traza, en el orden de los ng, µg o mg/kg. La detección de esos niveles de plaguicidas en presencia de grandes concentraciones de otros compuestos químicos que se encuentran naturalmente en las diferentes matrices, sea agua, suelo, alimentos, tejidos entre otros, es un desafío debido a que éstos compuestos pueden interferir en el análisis. Por esto, para lograr la determinación de los residuos de pesticidas a concentraciones tan bajas, la metodología analítica debe incluir las siguientes etapas:

-Preparación de la muestra: cada muestra requiere de un tratamiento determinado, filtración en caso de agua, liofilización y tamizado en el caso de suelos, y en el caso de los alimentos es el *Codex Alimentarius* quien establece que partes de cada alimento se debe analizar.^(108,120,121)

-Extracción: consiste en la remoción de él o los plaguicidas de los componentes mayoritarios de la matriz. Obteniendo una solución que consta de los analitos de interés más los compuestos co-extraídos en esas condiciones.

-Clean-up: consiste en la eliminación de los co-extractivos de la matriz que puedan interferir con el análisis del residuo de pesticida de interés.

-Análisis instrumental: la identificación, confirmación y cuantificación mediante una técnica adecuada.⁽¹²²⁾

5.1. Análisis de residuos de pesticidas en muestras ambientales

5.1.1. Análisis de pesticidas en suelo

En la literatura, el análisis de residuos pesticidas en suelos, lodos y sedimentos, es reportado con menor frecuencia que el análisis de agua o plantas, tal vez debido a la gran complejidad de estas matrices. Los residuos de pesticidas se encuentran en general unidos a las partículas del suelo, por lo que las metodologías de extracción deben ser cuidadosamente diseñadas para evitar una baja eficiencia en la extracción. A diferencia del agua, donde la mayoría de los métodos de extracción y clean-up reportados se basan en tres metodologías, Extracción Líquido-Líquido (LLE), Extracción en Fase Sólida (SPE) y Micro Extracción en Fase Sólida (SPME), los métodos descriptos para

suelos son mucho más variados. Las metodologías más reportadas para análisis de residuos de pesticidas en suelo son extracción con solventes, SPE, SPME, extracción mediante ultrasonido, extracción con fluido supercrítico y asistida por microondas.^(123,124)

Tratamiento de la muestra

Generalmente el muestreo del suelo para el análisis de pesticidas involucra a su capa arable, que es de 0-20 cm.⁽¹²¹⁾ Aunque muchas veces se hacen tomas de otras profundidades para estudiar la distribución de los pesticidas en el suelo, por ejemplo de 20-40 cm.⁽¹²¹⁾ Luego del muestreo, el suelo se seca, preferentemente en un liofilizador y posteriormente se tamiza para obtener una muestra homogénea y evitar la degradación de los analitos de interés por la acción microbiana.⁽¹²⁵⁾

5.1.2. Análisis de pesticidas en agua

Los pesticidas en matrices ambientales como el agua de ríos, mares, o aguas de la agricultura en general se encuentran muy diluidos. A pesar de que las nuevas generaciones de instrumentos son cada vez más sensibles, y en los últimos años se ha observado una tendencia a disminuir el clean-up y la pre-concentración de las muestras de agua, todavía es necesario realizar procesos de concentración de la muestra para lograr detectar estos contaminantes. Una revisión de la literatura revela como se indicó anteriormente, que las principales metodologías de extracción utilizadas para el análisis de pesticidas en agua son: LLE, SPE y SPME.

Tratamiento de la muestra

En general una vez recolectada la muestra, esta debe ser filtrada, mediante filtros de membrana de vidrio de 0,7 µm y posteriormente con filtros de teflón (PTFE) de 0,45 µm con el fin de remover partículas que puedan interferir en el análisis. A su vez, las muestras deben ser conservadas en freezer (-20 °C)

hasta el momento de su análisis para evitar la acción microbiana y la degradación de los compuestos de interés.

5.2. Análisis de residuos de pesticidas en alimentos

El análisis de residuos de pesticidas en alimentos es sumamente importante no solo para proteger la salud del ser humano sino también para el comercio internacional y los controles regulatorios. A nivel mundial existen más de 900 sustancias activas contra plagas. El gran número de posibles residuos de pesticidas, hace necesario el desarrollo de métodos multi-residuos (MRM) que permitan a los laboratorios realizar un control efectivo.

Hasta hace unos años un método multi-residuo implicaba el análisis de 10-15 pesticidas simultáneamente, pero debido al aumento del comercio de alimentos a nivel internacional, entre países que poseen diferentes regulaciones es crucial la expansión de estos MRM a un mayor número de pesticidas. Actualmente existen MRM altamente sensibles que incluyen el análisis de 100 o más pesticidas con límites de detección tales que aseguran el control de los LMRs.⁽¹²⁶⁾

Tratamiento de muestra

La extracción de los pesticidas de los alimentos depende de la polaridad y del tipo de matriz. En general consiste en la homogeneización de la muestra utilizando un dispositivo para realizar la homogeneización ya sea baño de ultrasonido, shaker, licuadora o mixer con un solvente orgánico o mezclas de solventes con agua, con o sin ajuste de pH.⁽¹²⁷⁾ Una vez homogeneizada la muestra, debe conservarse en freezer hasta el momento de su análisis.

Luego de la extracción por un método adecuado, en general se realiza un procedimiento de clean-up con el fin de eliminar compuestos que contiene la matriz y que pueden ser co-extraídos constituyendo una interferencia en el análisis cromatográfico, causando problemas durante la detección, identificación y cuantificación de los analitos.⁽⁸⁵⁾

5.2.1. Métodos MRM de extracción y clean-up para residuos de pesticidas

5.2.1.1. Procedimientos de extracción con solventes; Extracción Sólido-Líquido (SLE) y Líquido-Líquido (LLE)

La extracción con solvente es una de las técnicas más ampliamente usadas, como tal o combinada con una forma de agitación mecánica de forma de aumentar la eficiencia de la extracción, por ejemplo ultrasonido o shaker. Los solventes más comunes para la extracción de pesticidas son el acetonitrilo (ACN), el acetato de etilo (AcOEt) y la acetona ya que permiten la extracción de un gran número de pesticidas.⁽¹²⁸⁾ La selección de un solvente u otro depende de la composición química de la matriz y de las características de los pesticidas a analizar. El ACN es un solvente caro y tóxico, pero la principal ventaja es que prácticamente no extrae componentes lipofílicos, que muchas veces son los principales interferentes a la hora de realizar un análisis.

El AcOEt es parcialmente miscible en agua. Por su polaridad, es capaz de extraer compuestos no polares de aquellas matrices con alto contenido en lípidos. La principal ventaja es que las pequeñas cantidades de agua presentes en el extracto pueden ser fácilmente removidas mediante el agregado de sales anhidras, sin la necesidad del agregado de otros solventes para realizar particiones liquido-liquido.⁽¹²⁹⁾ La principal desventaja del AcOEt es que por su relativa baja polaridad muchos pesticidas polares no se reparten en la fase AcOEt por lo que las recuperaciones de este tipo de pesticidas pueden ser bajas. Para evitar esto algunos métodos multi-residuos realizan un salting-out utilizando grandes cantidades de sales, tales como Na_2SO_4 , NaCl y MgSO_4 . De esta forma las sales compiten con los analitos de interés por la solvatación con el agua, disminuyendo su afinidad por la fase acuosa y migrando hacia la fase orgánica.^(129,130) Otros co-solventes polares, como metanol y etanol, han sido usados para aumentar la polaridad de la fase orgánica. Diclorometano (CH_2Cl_2) y n-hexano han sido también usados para la extracción de pesticidas de baja polaridad a pesar de que estos últimos son altamente tóxicos para el ser humano.⁽¹²⁷⁾

La extracción con solventes presenta varias desventajas, es laborioso, consume mucho tiempo, en general usa grandes cantidades de solvente con la

consiguiente generación de una gran cantidad de residuos, requiere de varias etapas de clean-up, por lo que lleva mucho tiempo. Además muestras que contienen partículas en suspensión pueden formar emulsiones con el solvente orgánico, lo que lleva a mayores tiempos de análisis y variaciones en la reproducibilidad del método.⁽¹³¹⁾

A pesar de esto a lo largo de los años se han desarrollado diferentes metodologías de análisis de pesticidas que involucran pasos de extracción con solvente.

Las principales ventajas son que no es necesario un operario demasiado entrenado ni tampoco un equipo sofisticado, por lo que son de bajo costo.

5.2.1.1.1. Breve historia de los métodos MRM Acetonitrilo

Mills et al., en 1963 fueron los primeros en reportar un método de extracción multi-residuo utilizando ACN como solvente para pesticidas organoclorados en frutas y vegetales.⁽¹³²⁾ El método consistía en una extracción líquido-líquido con una mezcla éter de petróleo o hexano y un gran volumen de agua saturado en NaCl seguido de un clean-up con Florisil. A finales de los años 60, la introducción de los pesticidas organofosforados de mayor polaridad, obligó a los laboratorios de control a incorporar estos compuestos en las metodologías de análisis. En este caso, el uso de éter de petróleo no era adecuado para lograr una buena extracción de los pesticidas, dada la diferencia de polaridad entre este solvente y dichos compuestos. Para evitar bajas recuperaciones surgieron diversas alternativas para el análisis de frutas y hortalizas basadas en la extracción con ACN y NaCl para mejorar la separación de fases. En la literatura se reportan diversas metodologías para el análisis de pesticidas en alimentos basadas en este método de extracción con diferentes clean-up, tales como SPE con C-18 y celite entre otros.⁽¹³³⁾

La introducción de compuestos cada vez más polares hizo necesario el uso de la cromatografía líquida con detector ultravioleta, con arreglo de diodos, o acoplada a detector de masas, siendo el ACN uno de los solventes de elección. Por esta razón y sumado a la introducción de un nuevo método de extracción

dispersivo, el método de QuEChERS con ACN como solvente de extracción ha cobrado fuerza.⁽¹³⁴⁾

Acetona

En 1975, Luke et al., desarrollaron un método basado en la extracción con acetona, una posterior LLE con una mezcla en cantidades iguales de éter de petróleo y CH_2Cl_2 seguido de un clean-up con Florisil.⁽¹³⁵⁾ Este método no sólo permitía analizar pesticidas organoclorados sino también organofosforados y algunos carbamatos. La metodología de clean-up utilizada ocasionaba bajas recuperaciones de los pesticidas más polares, por lo que en 1981 estos autores sustituyeron el uso de Florisil por un mayor volumen de éter de petróleo que se adicionaba a continuación de la LLE para remover trazas de CH_2Cl_2 . Años más tarde se ajustaron las condiciones de esta metodología con el fin de disminuir la cantidad de muestra, solventes y sales. Este método se llamó Mini-Luke y actualmente hay varias aplicaciones en alimentos.^(135,136,137) Al igual que Luke et al., Specht et al., utilizaron la extracción con acetona y posterior extracción mediante LLE con éter de petróleo y CH_2Cl_2 adicionando una etapa de clean-up mediante cromatografía en gel permeación (GPC).⁽¹³⁸⁾ Esta variación se convirtió en un método oficial en Alemania y es conocido como el S-19 en el Manual de Residuos de Pesticidas de este país.⁽¹³³⁾ En la década del 90, para evitar el uso de solventes clorados, Specht et al., sustituyeron el CH_2Cl_2 por una mezcla AcOEt: ciclohexano (1:1) en la partición líquido-líquido.⁽¹³³⁾

Acetato de etilo

Uno de los primeros métodos de extracción de pesticidas basados en el uso de AcOEt fue reportado por Watts et al., en el año 1969, pero el uso de este solvente se popularizó recién en la década del 80. En 1987, Roos et al., reportaron la extracción de pesticidas en algunas matrices como frutas, hígado y cereales con AcOEt y Na_2SO_4 utilizando un procedimiento de clean-up mediante GPC utilizando Bio Beads SX-3 y cromatografía gaseosa.⁽¹³⁹⁾ Esta metodología ha sido utilizada para el monitoreo de residuos de pesticidas en la

Administración Nacional para la alimentación en Suecia desde el año 1989. Este método ha sido ajustado a lo largo de los años, por ejemplo, en 1994, Fernández-Alba et al., reportaron el uso de AcOEt para el análisis de organoclorados y piretroides con un posterior clean-up con SPE usando silica gel como adsorbente.⁽¹⁴⁰⁾ En la década del 2000, Agüera et al., introdujeron algunas modificaciones a este método, entre las cuales se incluyen la disminución del tamaño de muestra y solvente, la agitación con ultraturrax y eliminación de la etapa de clean-up con GPC.⁽¹⁴¹⁾ A partir del año 2003, Philström et al., adicionaron bicarbonato de sodio durante la extracción con el fin de ajustar el pH de las muestras en el rango 6 a 8, y mejorar la estabilidad de algunos pesticidas.⁽¹⁴²⁾ En el año 2007, Mol et al., reportaron el uso de una nueva modificación de esta metodología que consiste en la extracción de la muestra con AcOEt y posteriormente una etapa de clean-up con carbono grafitizado (GCB) y amina primaria y secundaria (PSA).⁽¹²⁹⁾ Los extractos obtenidos con los métodos previamente descritos, eran luego analizados mediante cromatografía gaseosa, en un principio con detectores específicos (FPD, NPD, ECD, entre otros), luego con detector de masas y en la última década con cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas en tándem.

5.2.1.2. Métodos de extracción mediante adsorción

5.2.1.2.1. Extracción en Fase Sólida (SPE)

La Extracción en Fase Sólida se basa en el paso de una muestra líquida por un cartucho, columna empacada o disco con un adsorbente sólido que retiene los analitos de interés, en nuestro caso, pesticidas. Una vez sembrada la muestra, el adsorbente utilizado se seca bajo una corriente de aire o N₂ y posteriormente los analitos de interés son eluidos con un solvente apropiado.

Previo a la aplicación de la técnica de SPE la muestra debe ser diluida en agua o un solvente orgánico para facilitar su paso a lo largo del cartucho.⁽¹⁴³⁾ Las muestras deben ser relativamente limpias para que los sólidos en suspensión y las sales no bloqueen el adsorbente. En el caso de aguas superficiales, por ejemplo, es necesaria una etapa de pre-filtración, que generalmente produce la

pérdida de compuestos hidrofóbicos que se encuentran ligados a los sólidos en suspensión.⁽¹³¹⁾

En los últimos años la SPE ha reemplazado a la técnica de LLE. Las principales causas son, la mayor eficiencia de extracción, menor consumo de solventes, facilidad de automatizar, mejor selectividad y mayor facilidad para su uso. Además una vez concentradas las muestras en el cartucho su transporte y el almacenamiento es mucho más práctico.

Una de las principales características de la técnica SPE es la gran cantidad de opciones disponibles comercialmente, no solo en cuanto a tipo de adsorbentes, sino también a cantidad de fase sólida contenida en el cartucho. La eficiencia de extracción depende del tipo de adsorbente y pesticida en estudio, del flujo utilizado, del acondicionamiento, de la elución y de la composición de la muestra que hacen que las recuperaciones de los pesticidas sean muy variables. Una de las principales ventajas de esta metodología es que se logra la purificación y pre-concentración de la muestra simultáneamente, alcanzando niveles de detección muy bajos, del orden de los μg ó ng/L .⁽¹⁴⁴⁾

SPE con cartuchos

Esta técnica consiste en la transferencia del analito desde la fase líquida a un sorbente sólido que generalmente se encuentra empacado en una columna (cartucho). Luego el compuesto de interés es eluido del adsorbente para su posterior análisis.⁽¹⁴⁴⁾

Existen varios adsorbentes disponibles y su selección dependerá fundamentalmente del tipo de analitos a determinar y del tipo de interferencias presentes en la matriz. Los adsorbentes más utilizados en SPE son: los adsorbentes de fase reversa como el C-8 y el C-18, los de fase normal: amino propil ($-\text{NH}_2$) y PSA, los de intercambio aniónico como el trimetil amonio (SAX) y GCB. Otros adsorbentes de fase normal como el Florisil (MgSiO_3), óxido de aluminio (Al_2O_3), y sílica (SiO_2) son también utilizados en combinación con los anteriores. Estos adsorbentes son seleccionados en función de las propiedades físico-químicas de los compuestos de interés y de la naturaleza de la muestra.⁽¹⁴⁵⁾

PSA: es un intercambiador iónico débil que interacciona con ácidos grasos, azúcares y otros ácidos orgánicos presentes en la muestra mediante puentes de hidrógeno.^(127,146)

C-8, C-18: son adsorbentes de fase reversa que retienen pigmentos lipídicos y otros lípidos.⁽¹⁴⁶⁾ Se desarrollaron con el fin de mejorar la selectividad de la sílica gel. Las propiedades funcionales del adsorbente dependen del porcentaje de C unido a la sílica, de la porosidad de la sílica y del tamaño de partícula, entre otros.

Sorbentes con Carbón: el GCB es útil para la remoción de pigmentos y esteroides, ya sea en arroz cáscara como arroz integral y para la extracción de muestras de agua con alto contenido en carbono orgánico, debido a que los ácidos fúlvicos (80% del carbono orgánico disuelto en aguas superficiales) se adsorben en los sitios aniónicos de la superficie del GCB y por lo tanto no pueden competir con los pesticidas no ácidos por la adsorción al GCB. La desventaja de este adsorbente es que retiene ciertos pesticidas planos y no polares reduciendo el porcentaje de recuperación de los mismos como reporta Takatori et al.^(114,146) Otros inconvenientes del uso de GCB es que pueden ocurrir posibles desorciones de compuestos de la matriz durante la elución. Así como también posibles reacciones entre el analito y el adsorbente.⁽¹³¹⁾

Resinas poliméricas: en estos materiales la retención de los analitos depende de interacciones hidrofóbicas. Son similares a C-18 pero debido a la presencia de grupos aromáticos en el polímero las interacciones entre estos y los analitos son más fuertes.⁽¹³¹⁾ Uno de los adsorbentes más utilizados en los últimos años ha sido el OASIS® HLB; éste es un co-polímero de fase reversa, formado por divinil benceno y n-vinilpirrolidona, que le otorgan a este adsorbente un balance de grupos lipofílicos – hidrofílicos apropiado para el análisis de una gran variedad de compuestos y además es fácilmente humedecible en agua lo que lo hace ideal para el análisis de muestras acuosas. Una de las principales ventajas de este adsorbente es que permite trabajar en todo el rango de pH.⁽¹⁴⁷⁾

SPE con discos

En esta metodología el adsorbente se une a un soporte sólido en forma de disco. Los analitos son adsorbidos por la fase estacionaria y luego son eluidos con la mínima cantidad de solvente orgánico. Los discos más utilizados son aquellos en los que se utiliza una fase sólida de C-8 o C-18.

5.2.1.2.2. Extracción Dispersiva en Fase Sólida (dSPE)

Actualmente es una de las metodologías más utilizada. Consiste en la extracción de una cierta cantidad de muestra con un solvente apropiado. El clean-up de una alícuota del extracto se realiza por medio de la dispersión de uno o más adsorbentes. Existen numerosas referencias en la literatura que reportan el uso de la técnica dSPE en cereales, especialmente relacionadas con el método de QuEChERS y sus modificaciones.^(148,149,150,151) A su vez, en este último tiempo, con el fin de simplificar y armonizar los métodos de rutina en los laboratorios de análisis, este método ha sido aplicado en suelos.⁽¹⁵²⁾

5.2.1.2.2.1. QuEChERS (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

El método de QuEChERS fue desarrollado en el año 2003 y es una alternativa muy empleada en la actualidad para el análisis multi-residuo de pesticidas en frutas y hortalizas por su alta eficiencia, bajo costo, sencillez y mínimo número de pasos.^(134,149,153) Se basa en la extracción de una muestra sólida con ACN con una etapa posterior de salting-out, seguido por un clean-up dispersivo en fase sólida para remover las posibles interferencias de la matriz. Es fácilmente adaptable según el tipo de matriz, los pesticidas a analizar y el equipamiento del laboratorio. En los últimos años se han desarrollado varias modificaciones en el método original, intentando mejorar las recuperaciones en matrices complicadas y de pesticidas problemáticos como captan, folpet, diclofluanid, pimetrozina y clorotalonil.⁽¹⁵⁴⁾ Dichas modificaciones consisten en el uso de sales que actúan como buffer durante la extracción para, de esta forma, mantener el pH en un valor adecuado para favorecer la recuperación de este

tipo de pesticidas. Así se desarrollaron dos variaciones de esta metodología que actualmente son muy utilizadas: QuEChERS acetato ^(151,154,155,156) y QuEChERS citrato.⁽¹⁵⁰⁾

En función de todo lo expuesto anteriormente se deduce que QuEChERS es un método versátil que permite trabajar a diferentes pH y realizar clean-up selectivos, en función del tipo de matriz y pesticidas a analizar, extendiendo de este modo el número de pesticidas a ser analizados.

QuEChERS acetato

Lehotay et al., demostraron que manteniendo el pH de la solución extractiva entre 4 a 5 se mejora la estabilidad de algunos pesticidas, como la pimetrozina, por lo que los autores proponen usar una solución de ácido acético (HAc) en ACN y acetato de sodio (NaOAc) como buffer, ya que ambos compuestos se encuentran típicamente en las frutas y por lo tanto no se introducen nuevas interferencias. Además, para mantener el número de pasos del método, agregaron HAc en el ACN y sustituyeron al NaCl por NaOAc.⁽¹⁵⁴⁾ De esta forma se genera una fuerte actividad buffer, que estabiliza a los pesticidas lábiles. La desventaja es que el clean-up con PSA pierde efectividad por la alta capacidad del buffer.⁽¹⁵³⁾

QuEChERS citrato

Anastassiades et al., buscaron una alternativa al método QuEChERS acetato con el fin de evitar el problema asociado al clean-up. El uso de una mezcla de citrato disódico y trisódico en la etapa de salting-out mostró muy buenos resultados excepto para matrices como limón, lima y frambuesas que presentan un pH < 3 y que requieren el agregado de hidróxido de sodio (NaOH) para ajustar el pH.⁽¹⁵³⁾

Adaptaciones de QuEChERS a matrices con bajo contenido de agua

El método original se desarrolló para matrices con alto contenido en agua (~80%). Por lo que matrices de bajo contenido en humedad como el arroz y otros cereales, previo a la extracción con solventes, requieren la adición de agua. El agua le provee la humedad necesaria para mejorar la accesibilidad del solvente en la matriz. Para el análisis de pesticidas en cereales mediante QuEChERS, se ha reportado el uso de diferentes cantidades de agua.^(149,150,151,155,157)

Particularmente para el análisis de pesticidas en arroz (blanco y paddy), se han reportado diferentes modificaciones de este método. En general estas modificaciones incluyen: cambios en el tipo y cantidad de sales, cantidad de PSA utilizada, la adición de ácido acético o fórmico al solvente de extracción.^(114,146)

Además se ha reportado el uso de bajas temperaturas durante el clean-up con el fin de precipitar compuestos lipídicos y ceras del extracto, esta práctica constituye una etapa de purificación extra cuando se tratan matrices con alto contenido de compuestos lipídicos, pero presenta la desventaja de que los compuestos más lipofílicos se pueden perder.⁽¹⁵⁰⁾ Este proceso de clean-up, denominado “freeze-out” ha sido reportado en otros cereales y pienso de animales como una práctica habitual para reducir co-extractantes, mejorando así la identificación y cuantificación de algunos pesticidas.⁽¹⁵⁸⁾

5.3. Aplicaciones de Análisis de Pesticidas en las Matrices Seleccionadas

5.3.1. Suelo

Powley describe el análisis de sulfonilureas en suelo a partir de la extracción de dichos herbicidas mediante SLE con una solución de MeOH y 0,1 M de carbonato de amonio (1:9) v/v, dicho extracto es centrifugado y el sobrenadante obtenido es purificado y concentrado mediante SPE con cartuchos del tipo OASIS® HLB previamente acondicionados. Los analitos de interés son eluidos con 10 mL de una solución 1 M de hidróxido de amonio y ACN seguido por 5

mL de AcOEt. Las fracciones eluidas se juntan y se evapora con N₂ para ser analizado mediante LC-MS/MS.⁽¹⁵⁹⁾

Arora et al., reportan el uso de soxhlet como medio de extracción. Estos autores determinaron lindano, pendimetalín, atrazina, carbendazím y clorpirifós en suelos de campos de arroz, con buenos resultados.⁽¹⁶⁰⁾ En los últimos años este método ha sido sustituido por otras técnicas de extracción como la agitación mecánica y el ultrasonido a temperatura ambiente con diferentes solventes orgánicos o mezclas de estos con agua con la intención de incluir el análisis de pesticidas termolábiles.⁽¹⁶¹⁾ A modo de ejemplo, Lambropoulou et al., determinó dos fungicidas, vinclozolina y dicloram mediante la extracción con acetona, durante 30 minutos en ultrasonido a temperatura ambiente y posterior clean-up mediante SPME.⁽¹⁶²⁾ Tor et al., comparó diferentes métodos de extracción; soxhlet, ultrasonido y shaker para el análisis de compuestos organoclorados utilizando una mezcla de éter de petróleo: acetona, los tiempos de extracción fueron 4 hs, 20 min y 3 hs para soxhlet, ultrasonido y shaker respectivamente. Los extractos obtenidos fueron purificados en una columna de alúmina y analizados mediante GC-ECD. Las recuperaciones obtenidas a partir de la extracción con ultrasonido fueron del orden del 100% por lo que estos autores establecen que este método es útil para el análisis de pesticidas organoclorados, ahorrando un 80% del tiempo comparado con los otros dos métodos testeados y una reducción de volumen de solvente de aproximadamente 67%.⁽¹⁶³⁾

Sánchez-Brunette et al., plantean un método basado en la sonicación de columnas pequeñas conteniendo muestras de suelo para el análisis de herbicidas e insecticidas en el suelo.^(164,165) Fenoll et al, también reportaron este sistema de extracción para el análisis de 25 insecticidas y fungicidas. El método consistió en la extracción con una mezcla de ACN: agua durante 20 min, seguido de una ELL con CH₂Cl₂. En este trabajo se utilizaron 3 tipos de suelos de diferente composición, resultando en porcentajes de recuperación diferentes para cada pesticida dependiendo del tipo de suelo, pero en general fueron entre 69 y 112%, con desviaciones estándares relativas (RSDs) menores que 6%.⁽¹⁶⁶⁾

Ranz et al., analizaron herbicidas polares mediante una extracción con una mezcla de agua ácida y MeOH. Luego de varias etapas de extracción se realiza un clean-up del extracto obtenido mediante cartuchos de sílica gel y los analitos de interés se derivatizan para analizarlos por GC-MS.⁽¹⁶⁷⁾ Ye y colaboradores, realizaron una extracción de suelo en ultrasonido con MeOH: buffer fosfato (2:8). A continuación compararon diferentes adsorbentes a ser purificados mediante extracción en fase sólida; C-18, OASIS® HLB y HXN. Por otro lado probaron 3 mezclas de solvente a utilizar como solvente de elución; buffer fosfato, buffer fosfato:MeOH (80:20), buffer fosfato:MeCN (80:20), a diferentes pH, siendo la mezcla de buffer fosfato:MeOH la que presentó mejores resultados. Por último compararon las recuperaciones obtenidas con los tres tipos de absorbente, los cartuchos de C-18 mostraron los mejores resultados.⁽¹⁶⁸⁾ Shen y colaboradores, reportaron el uso de una modificación de la técnica de MSPD usando Florisil como agente dispersante y acetona como solvente de extracción para el análisis de pirimicarb, metalaxil, metolaclor, isopropalín y pendimetalín en suelo. La extracción con acetona se realizó de forma continua, durante 1 h. El extracto obtenido se concentró y analizó mediante GC. Los porcentajes de recuperación de los pesticidas fueron aproximadamente 98% con RSDs menores que 10%.⁽¹⁶⁹⁾

En el año 2009, Wu et al., analizaron 4 sulfonilureas mediante dSPE seguida de micro extracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) y HPLC. El procedimiento de dSPE-DLLME consistió en la extracción del suelo con una solución de acetona: 0,15 M NaHCO₃ (2:8) seguido de un clean-up dispersivo con C-18. La DLLME se realizó a partir de una alícuota del extracto con 60 µL de clorobenceno, como solvente de extracción. El extracto centrifugado se analizó mediante HPLC. Los porcentajes de recuperación variaron entre 76-93% con RSDs entre 5 y 7%. Esta técnica, en comparación con otras metodologías tradicionales resultó una técnica fácil, rápida con bajo consumo de solvente.⁽¹⁷⁰⁾

Yang et al., analizaron 44 pesticidas en suelos a partir de una variación del método QuEChERS. Los autores agregaron agua a la muestra con el fin de otorgarle la humedad necesaria para luego realizar un salting-out utilizando

ACN y buffer citrato. Finalmente a una alícuota del extracto se le realizó un clean-up con MgSO_4 y PSA para analizarlo mediante GC-MS.⁽¹⁵²⁾

Lesueur et al., compararon 4 métodos de extracción diferentes: extracción mediante ultrasonido, extracción mediante líquido presurizado (PLE), QuEChERS y la Norma Europea DIN 12393, para el análisis de 12 herbicidas y dos productos de transformación. Los analitos fueron analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas usando una interfase de electrospray en modo positivo. Tanto la extracción con ultrasonido como QuEChERS permitieron analizar todos los analitos, siendo QuEChERS el método más eficiente. Con PLE y la Norma DIN 12393 no se pudo analizar ni carbendazím ni metamitrón.⁽¹⁷¹⁾

5.3.2. Agua

Geiss et al., compararon la eficiencia de 21 cartuchos con diferentes tipos de adsorbentes para la extracción de pesticidas organofosforados polares en agua. Concluyeron que los cartuchos con materiales poliméricos mostraron los mejores resultados y que en general, la recuperación de los pesticidas con un material u otro se puede correlacionar con el K_{ow} de cada pesticida.⁽¹⁷²⁾

Jeannot et al., describieron 2 procedimientos para el análisis de triazinas y sulfonilureas en aguas superficiales. Realizaron una extracción líquido-líquido de 1 L de agua con CH_2Cl_2 y por otro lado extrajeron 0,5 a 1 L de agua en cartuchos de C-18 y 10 L de agua en cartuchos de GCB (Carbopack B). La extracción líquido-líquido arrojó valores de recuperación entre 83-93% con RSDs entre 2 a 10%. Con la técnica de SPE con Carbopack B los porcentajes de recuperación fueron entre 60 y 96% con RSDs menores a 17%, mientras que las recuperaciones con C-18 se encontraron en el rango 67 a 100% con RSDs entre 2 y 7%.⁽¹⁷³⁾

En el año 2003, Zanella et al., validaron un método para la determinación de 2,4 D, quinclorac, bentazone, clomazone y propanil en muestras de aguas superficiales y de agricultura mediante HPLC con detector UV. El método consistió en la pre-concentración de las muestras en cartuchos de C-18. Los %

de recuperación de los herbicidas de interés fueron desde 85,7 hasta 109,8% con RSD menores que 14%.⁽¹⁷⁴⁾

Ayano et al., en el año 2004, describieron una metodología multi-residuo para la determinación de 5 sulfonilureas y 3 ureas en agua. El análisis se basó en la extracción de las muestras con tres cartuchos diferentes: poliestireno (PS2), C-18 y OASIS® HLB. Los compuestos se analizaron y cuantificaron mediante LC-MS. Las recuperaciones promedio para los compuestos en estudio se encontraron en el rango 70-120% con RSDs menores a 20% y Límites de Cuantificación (LOQs) entre 10 y 100 ng/L.⁽¹⁷⁵⁾ Carabías-Martínez et al., compararon la eficiencia de 3 cartuchos de extracción con diferente fase sólida para la determinación simultánea de 10 sulfonil y fenilureas y un producto de transformación; el 3-cloro-4-metil-fenil urea. Las muestras fueron concentradas 1000 veces utilizando cartuchos de C-18, OASIS® HLB y Lichrolut EN (sorbente polimérico de estireno y divinil benceno) obteniendo mejores resultados con los OASIS® HLB.⁽¹⁷⁶⁾ Polati et al., reportaron la determinación de 6 sulfonilureas y azoxistrobín en aguas superficiales. El método consistió en la pre-concentración de la muestra (factor 1000) con cartuchos Strata RP-18 E y dos fases poliméricas, Strata-X and Lichrolut EN, seguido del análisis mediante HPLC-UV (240 nm)-MSⁿ. Mediante esta técnica se alcanzaron límites de detección (LOD) menores de 26,9 ng/L con recuperaciones entre 81 y 113% para los cartuchos Strata RP-18 E y Strata-X pero los cartuchos Lichrolut EN no mostraron buenos resultados para ninguno de los pesticidas analizados.⁽¹⁷⁷⁾ En el año 2007, Kuster et al., analizaron 17 herbicidas polares, en aguas provenientes del delta del Río Ebro durante el período de mayor cultivo de arroz. Estos autores reportaron un método automatizado en el cual las muestras se analizaron mediante SPE acoplada con cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem. Para la extracción de los analitos de interés se utilizaron cartuchos conteniendo un polímero de divinilbenceno (cartuchos Hysphere Resin GP). Se cargaron 10 mL de la muestra y los analitos se eluyeron directamente en la columna cromatográfica. Algunos de los herbicidas, alaclor, molinato, propanil, diurón y clorotolurón presentaron recuperaciones menores que 60% mientras que atrazina, metolaclor y cianazina presentaron recuperaciones mayores que 120%.⁽¹⁹⁾

Mazzella et al., desarrollaron un método para la determinación simultánea de 30 triazinas, fenilureas y herbicidas tipo cloroacetanilidas en agua dulce y de estuarios. La pre-concentración de las muestras se realizó en cartuchos OASIS® HLB con recuperaciones entre 73 a 122% y RSDs entre 6 y 22%.⁽¹⁷⁸⁾

Ouyang et al., evaluaron la eficiencia de diferentes sorbentes, C-18, OASIS® HLB y Cleanert HXN (cartucho polimérico de poliestireno y divinilbenceno para pesticidas polares) para el análisis de 10 sulfonilureas. Las tasas de recuperación fueron mayores para los cartuchos HLB, en el entorno 77 hasta 109% con RSDs desde 0,3 hasta 14%.⁽¹⁷⁹⁾

Van Pinxteren et al., compararon la eficiencia de SPE y extracción con solvente asistida con membrana (MASE), para el análisis de 10 pesticidas en agua. Los autores concluyeron que SPE tiene mayor sensibilidad, mientras que MASE es un procedimiento más rápido, provee mejores recuperaciones y presenta una alternativa para el análisis de compuestos de polaridad baja a media.⁽¹⁸⁰⁾

Muchos otros autores describen métodos de determinación de pesticidas, de diferentes clases y polaridades mediante SPE con excelentes resultados.^(152,179,181,182,183)

Carabías-Martínez et al., emplearon una fibra de poliacrilato para la determinación de 10 herbicidas (alaclor, atrazina, clorotolurón, diclofop, diflufenicam, etofumesata, isoproturón, linurón, terbutrín y trifluralina) en agua superficial y subterránea. Estos autores reportan que las fenilureas se degradan térmicamente por lo que realizan la identificación de las anilinas correspondientes. Los porcentajes de recuperación de estos herbicidas se encontraron en el rango 94 hasta 107 con un límite de detección (LOD) de 1 µg/L.^(184,185) En el año 2008, Crespo-Corral et al., describieron el análisis de carbamatos y herbicidas tipo fenilureas y fenoxiácidos. El método consistía en la pre-concentración de la muestra en cartuchos de C-18 seguida del análisis mediante cromatografía gaseosa luego de una reacción de derivatización de los analitos de interés. Los porcentajes de recuperación reportados se encontraron en el rango 81 a 99% con RSDs de entre 0,9 y 21%.⁽¹⁸⁶⁾

5.3.3. Arroz

Con respecto al arroz, actualmente no existe un método oficial para la determinación de pesticidas. En la literatura existen numerosas metodologías reportadas para el análisis de pesticidas en esta matriz, muchos de ellas involucran varias etapas de clean-up o métodos instrumentales, como extracción con fluido supercrítico, extracción acelerada con solvente y cromatografía mediante gel permeación, resultando en métodos poco sencillos y de elevado costo. Sin embargo en los últimos tiempos se han reportado metodologías basadas fundamentalmente en la filosofía dispersiva de QuEChERS aplicados al análisis de residuos de pesticidas en arroz.

Takatori et al., emplearon un cartucho conteniendo dos capas con adsorbentes diferentes (GCB y PSA) para remover pigmentos y ácidos grasos de extracto de arroz. La elución de los pesticidas del estudio se realizó con una mezcla de ACN: tolueno (3:1). La adición de tolueno mejora la elución de los componentes de interés, especialmente aquellas moléculas de estructura plana que podrían permanecer retenidas al GCB y por lo tanto presentar bajas recuperaciones. El método propuesto por estos autores se aplicó para la determinación de residuos de 47 pesticidas en vegetales, frutas y cereales, particularmente soja y arroz con porcentajes de recuperación (% Rec) en el rango 70-120% y muy buenas RSDs.⁽¹²⁹⁾

Zhang et al., analizaron pesticidas en arroz con cáscara para lo cual utilizaron una extracción con AcOEt seguido por una etapa de clean-up con GPC y columna de Florisil. Este adsorbente tiene una buena capacidad para interaccionar con interferencias que son co-extraídas con AcOEt y que no son eliminadas mediante GPC, aunque algunos pesticidas como mevinfos, ometoato, diazinón, disulfotón y demetón-S-metil presentaron dificultades en su elución de la columna de Florisil y, por lo tanto, bajas recuperaciones. Otra desventaja observada en este trabajo fue que el uso de AcOEt como solvente de elución no logra una buena recuperación de pesticidas polares como el acefato, metamidofós y diclorvos.⁽¹⁸⁷⁾ Aguilera et al., estudiaron la extracción con fluido supercrítico seguido por una extracción en fase sólida en línea con propil amino, hidromatrix, Extrelut y Florisil como adsorbente para la

eliminación de compuestos lipídicos tanto de arroz blanco como integral. La extracción se evaluó usando CO₂ puro y CO₂ con agua o MeOH como agente modificador. El extracto más limpio se obtuvo con el adsorbente propil amino, con el cual se obtuvieron buenos resultados para 20/22 de los pesticidas estudiados usando MeOH como modificador. Captafol y dimetoato no pudieron ser analizados con esta metodología.^(149,188)

Nguyen et al., analizaron arroz con cáscara mediante el método de QuEChERS con 2 variaciones; el extracto en ACN fue dejado en el refrigerador por 30 min previo a la adición de las sales usadas para el salting-out y además en la etapa de clean-up dispersivo adicionaron GCB junto con el PSA y el MgSO₄. El GCB se añadió con el objetivo de remover los pigmentos presentes en el arroz con cáscara, de esta forma se obtienen extractos más limpios, pero con la desventaja de que algunas moléculas no polares y planas como el clorotalonil, bromacilo, alaclor, clorpirifós, diclorobenilo, paratión, terbufós, pendimetalín y quintozeno se obtienen con un bajo porcentaje de recuperación.⁽¹¹⁴⁾

Koesukwiwat et al., utilizaron el método de QuEChERS citrato para mejorar el porcentaje de recuperación de pesticidas sensibles al pH básico y ácido. Además evaluaron diferentes mezclas de adsorbentes (PSA; C-18, GCB, alúmina neutra) para realizar el clean-up dispersivo y así eliminar las interferencias que pueda contener el extracto de ACN a ser analizado. Estos autores establecen que el uso de este tipo de adsorbente tiene una gran influencia en el % de recuperación de muchos compuestos, en particular de los herbicidas fenoxiácidos. Este grupo de herbicidas son fuertemente retenidos por el PSA, resultando en bajas recuperaciones, C-18 presentó mejores resultados, donde 9/13 de los herbicidas presentaron buenas recuperaciones aunque el rendimiento del picloram fue muy bajo y el clopiralid no fue detectado. Las mezclas seleccionadas fueron C-18/GCB y C-18/alúmina neutra. Las recuperaciones fueron más bajas usando la mezcla conteniendo GCB que la mezcla conteniendo alúmina.⁽¹⁴⁶⁾ Liu et al., y Nguyen et al., también reportaron diferentes métodos para el clean-up de arroz, usando los mismos adsorbentes.^(116,189)

El laboratorio de referencia europeo para pesticidas en cereales y alimento de animales describe un método multi-residuo, basado en el método de

QuEChERS, para el análisis de 62 pesticidas en harina de arroz, trigo, centeno y avena. La mayoría de los pesticidas presentaron porcentajes de recuperación en el rango 75-115% con LOQs de aproximadamente 10 µg/kg. Los compuestos dietofencarb, flusilazol, binapacril, kresoxim-metil, fenamifos, fludioxonil, flutolanil, hexaconazol y iodofenfos no cumplieron con los requerimientos debido a picos de interferencias de la matriz para los 4 tipos de harina.⁽¹⁹⁰⁾

Mastovska et al., estudiaron varias modificaciones al trabajo original de QuEChERS para el análisis de pesticidas en cereales. Los autores usaron 25 mL de una mezcla 1,5:1 de H₂O: ACN para la extracción de 5 g de arroz blanco y una etapa posterior de clean-up con 150 mg de PSA y 50 mg de C-18 para la adsorción de lípidos. Además se realizó la agitación durante una hora con un shaker orbital en vez de agitación manual de 1 min como lo indica el método original. Los compuestos analizados presentaron recuperaciones en el rango 70-120% con RSD menores que 20%.⁽¹⁵⁷⁾

Dórea et al., desarrollaron una metodología para el análisis simultáneo de malatión, paratión-metil y β-endosulfán. En este trabajo se compararon dos adsorbentes, alúmina neutra y sílica, usando AcOEt y n-hexano como solventes de elución. Las recuperaciones fueron aceptables en ambos casos, pero mayor cantidad de interferencias fueron extraídas utilizando sílica como adsorbente.⁽¹⁹¹⁾ Recientemente, Tsochatzis et al., compararon el solvente de extracción y la cantidad de alúmina utilizada como agente dispersante para el análisis de 8 pesticidas comúnmente empleados en el cultivo de arroz, penoxsulám, triciclazol, propanil, azoxistrobín, molinato, profoxidím, cihalofop-butil, deltametrina, y 3,4-dicloroanilina, el principal metabolito del propanil. Los autores reportaron que una relación 1:2, entre la cantidad de muestra y el agente dispersante, usando ACN como solvente de extracción presenta una buena recuperación, entre 85-105%.⁽¹⁹²⁾

Lee et al., estudiaron el nivel de residuos de 47 pesticidas en arroz blanco cocido; la metodología empleada consistió en la extracción del arroz con ACN seguido de la agitación del extracto en shaker durante 20 min y posterior agitación mediante ultrasonido por 10 min. El extracto fue analizado mediante cromatografía líquida, sin clean-up. A 10 µg/kg la mayoría de los pesticidas

presentaron recuperaciones en el rango 70-140% excepto para clotianidina, cinosulfurón, etiofencarb y metabenzthiazurón cuyos porcentajes de recuperación fueron menores a 70%.⁽¹¹⁸⁾

En 2006, Liu et al., analizaron 40 pesticidas en arroz, después de su extracción con CH_2Cl_2 y Na_2SO_4 en un baño de ultrasonido, seguido por una etapa de clean-up con SPE usando un cartucho de Florisil. En este trabajo diclorvos y dimetoato no se pudieron detectar, probablemente debido que hayan permanecido en la fase acuosa durante la extracción por su alta solubilidad en agua.⁽¹⁸⁹⁾

Liu et al., reportaron el uso de ultrasonido como método de extracción de 7 pesticidas en arroz. Los autores probaron 3 solventes, acetona, AcOEt y ACN, siendo este último el que mostró mejores resultados. Posteriormente se realizó el clean-up del extracto obtenido con cartuchos de Oasis[®] HLB para disminuir la cantidad de ácidos grasos co-extraídos con el solvente. Las recuperaciones de estos 7 pesticidas se encontraron en el rango de 70 a 120% con RSDs menores a 20%.⁽¹⁹³⁾

Pareja et al., compararon diversas metodologías de extracción y clean-up para la determinación de 42 residuos de pesticidas en arroz blanco basadas en el método de QuEChERS. El método original y la variación utilizando buffer acetato sin clean-up mostraron el mejor desempeño. Sin embargo los autores reportan que ninguno de los métodos evaluados permite el análisis de todos los compuestos seleccionados simultáneamente.⁽¹⁹⁴⁾

6. Técnicas Instrumentales de Análisis

Desde 1970 hasta la década del 90 la mayoría de los métodos de rutina para el análisis de pesticidas en muestras de origen ambiental o alimentario se basaron principalmente en la cromatografía gaseosa (GC) con diferentes detectores tales como detector de Captura de Electrones (ECD), detector de Nitrógeno y Fósforo (NPD), detector Fotométrico de Llama (FPD). Estos son detectores selectivos, pero no otorgan información acerca de la estructura de los compuestos, por lo que no son los de elección para el desarrollo en un método multi-residuo.

La introducción del detector de masas (MS) permite la identificación y confirmación simultánea de compuestos con una adecuada sensibilidad. Este detector puede ser acoplado tanto a un cromatógrafo de gases (GC-MS) como a un cromatógrafo de líquidos (LC-MS), permitiendo la separación e identificación de mezclas complejas en un solo análisis.^(29,195)

6.1. Espectrometría de masas

Un espectrómetro de masas consta básicamente de una fuente de ionización que produce iones, un analizador que los clasifica por su masa y un detector que mide la intensidad relativa de las diferentes masas. El principio de todos los espectrómetros de masas es que el comportamiento de una corriente de iones en fase gaseosa, a través de un campo electromagnético es dependiente de la relación masa-carga (m/z) de los iones y dicha relación es usada por el analizador para distinguir unos de otros, consiguiendo así su separación.

Los modos de operación del espectrómetro de masas son:

Modo “full scan”: el detector “barre” en un rango de masas previamente definido, típicamente de 50 a 600 umas, pero no lo hace de forma simultánea. Esto insume un tiempo (dwell time) para cubrir ese rango de masas, del orden de milisegundos. En ese tiempo, el detector no puede detectar cuantitativamente a todos los iones que llegan a él.

Modo SIM (Single Ion Monitoring): A diferencia de otros procedimientos de adquisición, como el full scan, donde el equipo barre todo el rango de masa seleccionado, en el análisis por SIM son monitoreados sólo los valores de m/z seleccionados. De esta forma, el equipo no “pierde” tiempo en barrer valores de m/z sin utilidad. De esta forma la sensibilidad es hasta 50 veces mayor que en modo full scan, permitiendo el análisis cuantitativo de los compuestos de interés, incluso a nivel de trazas, mediante GC-MS o LC-MS.

6.2. Cromatografía gaseosa con detector de masas (GC-MS)

La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas es una de las principales herramientas utilizadas en el análisis de residuos de pesticidas ya

que permite la separación, identificación y confirmación de un gran número de compuestos simultáneamente en un único análisis. Las ventajas más importantes de los métodos basados en GC-MS son:

- Alta sensibilidad y eficiencia de separación.
- Gran capacidad de identificación por la abundante información que otorgan los espectros de masa.
- Posibilidad del uso de bibliotecas comerciales de espectros.

6.2.1. Modos de ionización

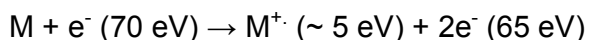
En GC-MS la ionización de los compuestos se puede realizar mediante impacto electrónico (EI) o ionización química positiva o negativa (PCI, NCI).^(29,130)

6.2.1.1. Impacto Electrónico (EI)

Un filamento calentado emite electrones que son acelerados dentro de la cámara de ionización por una diferencia de potencial generalmente de 70 eV. La ionización de la muestra se produce por la remoción de un electrón de la molécula generando un ión cargado positivamente con un electrón desapareado. Moléculas neutras, en fase gaseosa, a una presión de 10^{-5} torr, son bombardeadas por electrones, con una energía típica de 70 eV. Ocurre principalmente el desplazamiento o captura de un electrón formando iones $M^{+\cdot}$.⁽¹⁹⁶⁾

La alta energía de los electrones produce la formación del ión molecular y posteriormente la fragmentación de las moléculas de manera específica en iones cargados, llamados iones fragmento. Dicha fragmentación es única para cada molécula. El patrón de fragmentación que ocurre a través de mecanismos predecibles es una huella digital que permite la identificación inequívoca de cada compuesto.⁽¹⁹⁷⁾

En general los iones positivos son predominantes (~100 veces más). Los M^+ se vuelven importantes para moléculas con alta energía de activación



A partir de los años 50 se han registrado los espectros de muchos compuestos orgánicos conocidos empleando el impacto electrónico como modo de ionización.⁽¹⁹⁸⁾

En general los espectros son reproducibles; pudiéndose construir bibliotecas de espectros de EI a 70 eV; lo que constituye una ventaja al momento de la identificación y confirmación de un analito.⁽¹⁹⁶⁾

Se aplica a moléculas de media y baja polaridad y bajo PM (~500 uma), volátiles y termo-estables.

6.2.1.2. Ionización Química (CI)

Un gas reactivo (metano, amoníaco, isobutano, acetonitrilo) es introducido en exceso en la fuente de iones de forma controlada. El gas reactivo es bombardeado con electrones (150-200 eV) generándose una serie de especies nuevas (iones y electrones de baja energía). Posteriormente las moléculas de la muestra interaccionan con los iones del gas reactivo y se ionizan. Las condiciones de la fuente (presión, temperatura y energía electrónica) controlan el tipo y proporción de las nuevas especies generadas. El sistema puede estar configurado para detectar iones positivos (PCI) o iones negativos (NCI).⁽¹³⁰⁾

Las ventajas del modo EI son la baja influencia de la estructura molecular en la respuesta y el gran número de iones fragmento característicos generados. La ionización química prácticamente no se usa en métodos multi-residuo, pero varios pesticidas (organoclorados, piretroides y organofosforados) presentan una mejor selectividad en comparación con EI, además no provee demasiada información, ya que muchas veces genera poca cantidad de fragmentos.⁽²⁹⁾

6.2.2. Analizadores

Una vez formados los iones en la fuente de ionización, son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) en un analizador de masa. Existen cinco clases de analizadores disponibles: sector magnético, tiempo de vuelo, analizador con transformada de Fourier, trampa de iones, y cuadrupolo, siendo

estos 2 últimos los más empleados para el análisis de pesticidas, mediante GC.⁽¹³⁰⁾

6.2.2.1. Cuadrupolo

Es un filtro de masa que consiste en cuatro barras paralelas. Las barras opuestas tienen la misma polaridad mientras que las barras adyacentes tienen polaridad opuesta. A cada barra se le aplica un voltaje continuo y uno de radiofrecuencia generando una diferencia de potencial que permite la “filtración” de los iones de m/z seleccionada. Modificando los campos eléctricos, las masas de todos los iones pueden ser “escaneadas” secuencialmente, para generar un espectro de masas. En modo SIM, la selectividad viene dada porque sólo los iones de masa seleccionados, conforme a las condiciones de operación del método analítico, van a atravesar el analizador para llegar al detector. En la **Figura 11** se muestra una representación esquemática de un analizador de cuadrupolo.⁽¹³⁰⁾ El uso de este analizador está muy extendido debido a su relativa sencillez y relativo bajo costo. El cuadrupolo no es muy sensible en modo *full scan*, por lo que para el análisis de residuos de pesticidas se suele utilizar en modo *SIM*. Este modo presenta una mayor sensibilidad, pero requiere el conocimiento previo de los compuestos que se van a analizar, ya que sólo se utilizan los iones seleccionados y no el barrido completo de iones de la muestra.

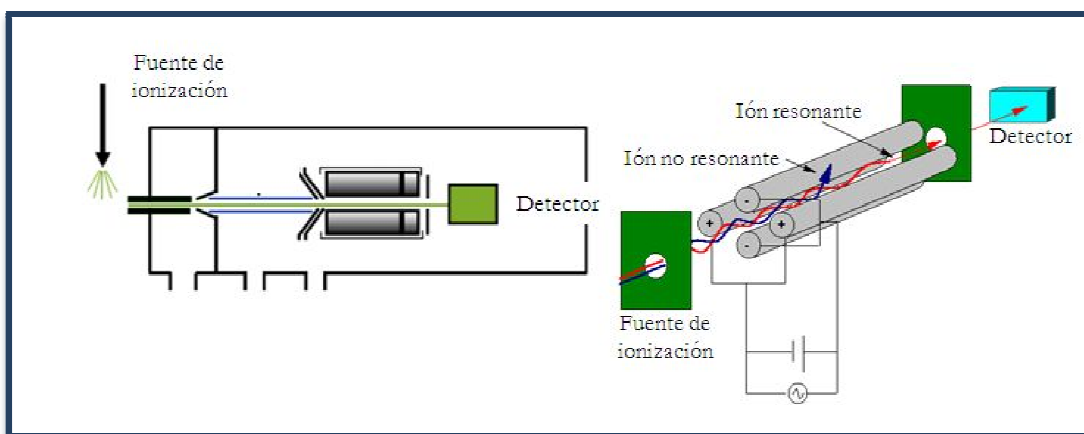


Figura 11. Esquema de analizador de Tipo Cuadrupolo Simple. (Figura adaptada de Agilent Technologies Inc. y <http://chromservis.cz/section/chromatography>).^(199,200)

Esta técnica instrumental ha sido reportada para el análisis de compuestos no polares, volátiles y semi-volátiles. Por ejemplo los piretroides pueden ser analizados solamente por EI a 70 eV.

Sin embargo, compuestos polares, no volátiles e inestables térmicamente, como las fenilureas, carbamatos, compuestos pirimidínicos, triazoles, y muchos productos de transformación no pueden ser analizados mediante esta técnica, por lo que la técnica de elección es LC.⁽¹²⁷⁾

6.2.2.2. Trampa de iones

En este sistema los iones generados en la fuente son “atrapados”, durante un cierto tiempo, en un campo de radiofrecuencia dentro de un anillo toroidal situado entre dos electrodos hiperbólicos. Mediante la aplicación simultánea de corrientes continuas y radiofrecuencia se consigue “atrapar” y mantener dentro del anillo central a los iones provenientes de la fuente de iones. Una vez allí, dichos iones pueden ser extraídos a voluntad aplicando corrientes de radiofrecuencia variables hasta valores de resonancia y expulsarlos a través del anillo de salida. La **Figura 12** muestra una representación esquemática de un analizador de trampa de iones. Un espectro de masas completo se obtiene mediante el barrido de un rango de radiofrecuencia determinado. Una ventaja particular de este analizador es la posibilidad de utilizarlo en la técnica de masas masas (MS^n), puesto que permite la extracción de iones individuales (Iones Precursores) que posteriormente pueden ser fragmentados para análisis estructural (Iones Fragmento). Las trampas de iones presentan mayor sensibilidad en modo *full scan* que los analizadores cuadrupolares además tiene la particularidad de poder realizar experimentos múltiples de MS/MS (MS^n), atrapando primero un ión específico, fragmentándolo y atrapando después un nuevo ión producto para fragmentarlo de nuevo, y así sucesivamente. Esta herramienta es única de la trampa de iones y es muy útil para la identificación de compuestos desconocidos.

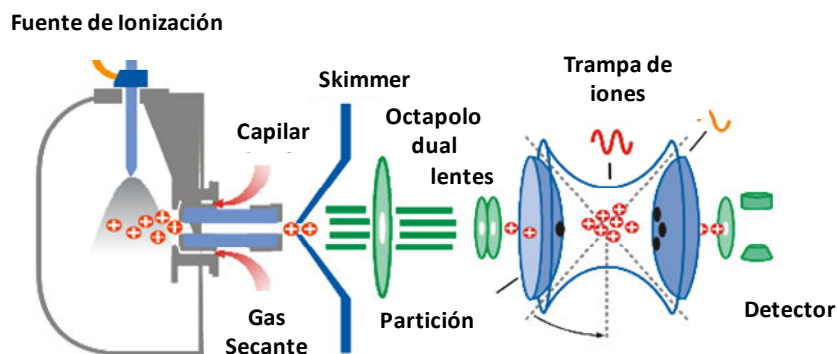


Figura 12. Esquema de analizador de trampa de iones. (Figura adaptada de www.bdal.de).⁽²⁰¹⁾

6.3. Cromatografía líquida

Diez años atrás la técnica de cromatografía de líquidos era poco utilizada para el análisis de residuos de pesticidas. Sin embargo, los fabricantes de agroquímicos fueron desarrollando compuestos cada vez más polares, de menor volatilidad y más termolábiles, los que no pueden ser analizados por GC, impulsando un aumento en el número de métodos analíticos de residuos de pesticidas empleando cromatografía líquida primero con detector UV, posteriormente con detector de arreglo de diodos (LC-DAD) y en los últimos años con la incorporación de instrumentos de LC-MS y LC-MS/MS que proveen una gran sensibilidad y eficiencia.^(131,202)

6.3.1. Cromatografía líquida con Detector de Arreglo de Diodos (LC-DAD)

Desde los comienzos de la cromatografía líquida, los detectores más utilizados fueron los fotómetros basados en la absorción de luz visible y ultravioleta (UV). Estos detectores son sensibles a muchos solutos, siempre que absorban en el rango 190-600 nm apróx. La selección apropiada de la fase móvil hace posible trabajar a longitudes de onda (λ) en el entorno de 200-215 nm, donde la mayoría de los compuestos orgánicos exhiben cierta absorbancia al UV.⁽²⁰³⁾ Los detectores UV existen en tres tipos de configuración, de λ variable, de λ fija y de arreglo de diodos (DAD). El DAD posee una trayectoria similar al camino

óptico del detector de longitud de onda variable, excepto que la luz proveniente de la lámpara pasa a través de la celda de flujo antes de llegar a la rejilla de difracción. Esto permite que la rejilla disperse el haz de luz incidente a través de una serie de fotodiodos obteniéndose el espectro UV del analito que eluye.⁽²⁰³⁾ Este detector permite operar a la λ máxima de un soluto o a aquellas λ que proveen una máxima selectividad, incluso permite variar las λ de medida en un mismo análisis pudiendo guardar el espectro completo de los compuestos a lo largo del análisis. De esta forma se pueden identificar los analitos no solo por el tiempo de retención con respecto a un estándar sino también por comparación del espectro del compuesto.⁽²⁰³⁾

En la literatura existen numerosos reportes basados en el análisis de pesticidas en agua, suelo y grano de arroz mediante cromatografía líquida con detector UV-DAD. Especialmente para el análisis de herbicidas polares y semi polares, tales como sulfonilureas, fenilureas y otros.^(170,192,204)

6.3.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

En los últimos años el uso de LC-MS/MS ha crecido enormemente, principalmente debido a la alta sensibilidad, que permite alcanzar niveles de detección muy bajos y a la elevada capacidad para la identificación y confirmación de los analitos por la posibilidad de realizar espectros de masa, por lo que han permitido el desarrollo de métodos sensibles capaces de identificar contaminantes a niveles trazas en muestras ambientales y alimentos.^(173,176,185,205)

6.3.2.1. Sistemas de ionización

Después de la introducción de la muestra desde el sistema HPLC, ésta es ionizada en la fuente de ionización. Existen diferentes tipos de fuentes de ionización; termospray, particle beam, foto-ionización a presión atmosférica (APPI) e ionización a presión atmosférica (API), siendo esta última una de las más utilizadas.^(130,206)

6.3.2.1.1. Ionización a Presión Atmosférica (API)

Es un proceso de ionización suave, a presión atmosférica (P. atm.) con una alta eficiencia, en comparación con otras formas de ionización convencionales. Incluye un grupo de interfases llamadas Electrospray (ESI) e Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI).⁽²⁰⁶⁾

6.3.2.1.1.1. Electrospray (ESI)

En modo positivo, el efluente del LC es bombeado a través de una aguja nebulizadora que se encuentra a un potencial bajo y éste pasa a través de un electrodo semicilíndrico que se encuentra a un alto potencial. La diferencia de potencial producida entre la aguja y el electrodo genera un campo eléctrico que carga la superficie del líquido y forma gotas cargadas. Éstas son conducidas a través de un capilar que por medio de un gas a alta temperatura (N₂) elimina el solvente no cargado. A medida que las micro gotas atraviesan el capilar las cargas positivas migran hacia la superficie de la micro gota mientras que las cargas negativas permanecen en el centro de esta. Paralelamente el solvente continúa evaporándose hasta que el tamaño de la micro gota es tal que se rompe. En este momento el campo eléctrico generado es tal que logra ionizar el analito eliminando el resto del solvente, generando así iones cargados (sin solvente). Una vez obtenidos los iones, se introducen formando un ángulo de 90° con el analizador, separándolos así de las moléculas neutras (**Figura 13 a**). Dadas las características de ESI su aplicación, es indicada principalmente para el análisis de compuestos polares.^(130,206)

6.3.2.1.1.2. Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)

Se basa en la reacción de moléculas e iones en fase gaseosa, que lleva a la ionización del analito a presión atmosférica. El proceso es similar al de ionización química, se nebuliza el solvente para formar un aerosol y los iones reactivos son producidos por una gran diferencia de potencial a través de una aguja corona. Este proceso se da a presión atmosférica, por lo que la

frecuencia de colisiones entre los iones de solvente y los de la muestra es alta, generándose iones, en un proceso altamente eficiente (**Figura 13 b**). Este modo de ionización es suave generando moléculas protonadas del tipo $[M+H]^+$ en el modo positivo y $[M-H]^-$ en el modo negativo. Esta técnica es útil para el análisis de compuestos de polaridad media o baja o moléculas térmicamente estables que requieren mayor energía de ionización y permite aplicar flujos de hasta 2 mL/min, pero presenta la desventaja de que algunos pesticidas pueden sufrir degradación térmica, en comparación con ESI.^(130,206)

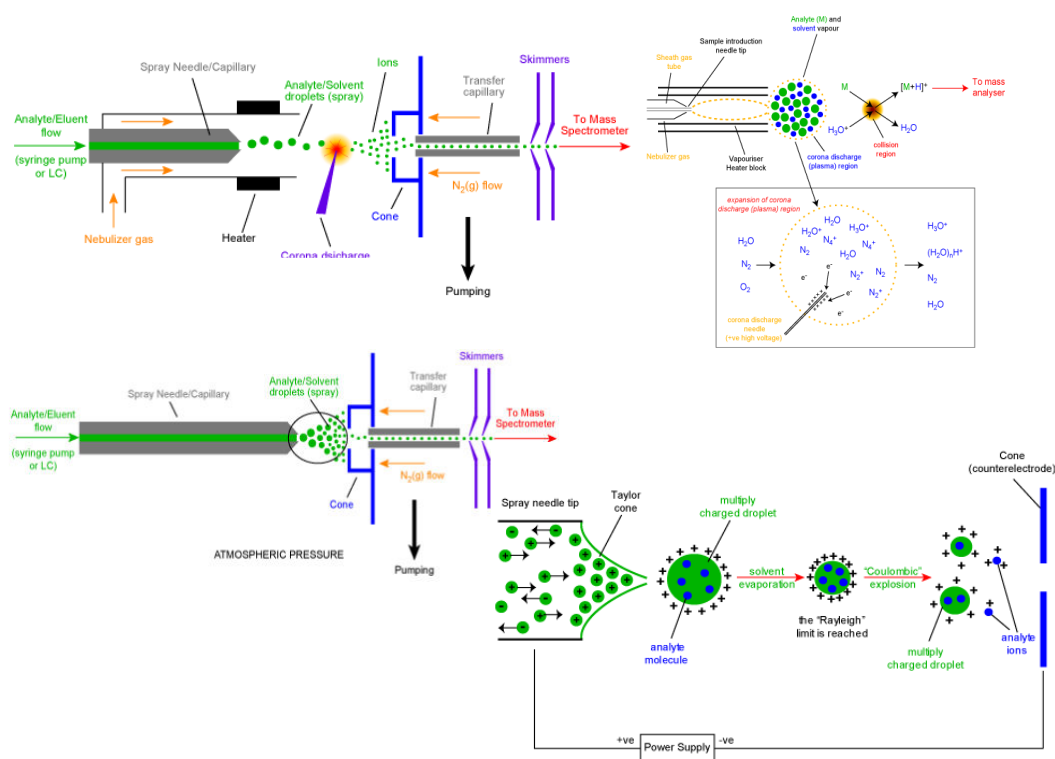


Figura 13 a. Esquema del proceso de formación de iones en ESI; **b.** Esquema del proceso de formación de iones mediante APCI. (Figuras adaptadas de la pagina web de la Universidad de Bristol).⁽²⁰⁷⁾

6.3.3. Analizadores

Desde la fuente de ionización utilizada, los iones son transferidos al espectrómetro de masas, donde son separados según su relación m/z . El analizador opera en condiciones de vacío que aseguran el desplazamiento de los iones con la máxima eficacia. Los diferentes tipos de analizadores

incorporados en los sistemas LC-MS/MS son el triple cuadrupolo y el tiempo de vuelo y los sistemas híbridos: cuadrupolo acoplado a trampa de iones lineal y cuadrupolo acoplado a tiempo de vuelo. Estos sistemas se detallan a continuación.

6.3.3.1. Analizador Triple Cuadrupolo (QqQ)

Este sistema está formado por dos cuadrupolos con una celda de colisión entre ellos (tercer cuadrupolo), **Figura 14**. Los iones generados en la fuente de ionización son dirigidos hacia el primer cuadrupolo (Q1) en donde se seleccionan los iones precursores de los analitos a estudiar, éstos son acelerados hacia el segundo cuadrupolo (Q2) o cámara de colisión que consiste en un hexapolo que contiene un gas de colisión (generalmente N₂) y donde tiene lugar la fragmentación inducida por colisión (CID). Los iones fragmento generados en la celda de colisión son direccionados al tercer cuadrupolo (Q3) en un segundo paso de filtrado, para conseguir aislar y analizar un ión precursor e iones producto. De esta forma se utilizan el primer y tercer cuadrupolos como analizadores.⁽²⁰⁰⁾

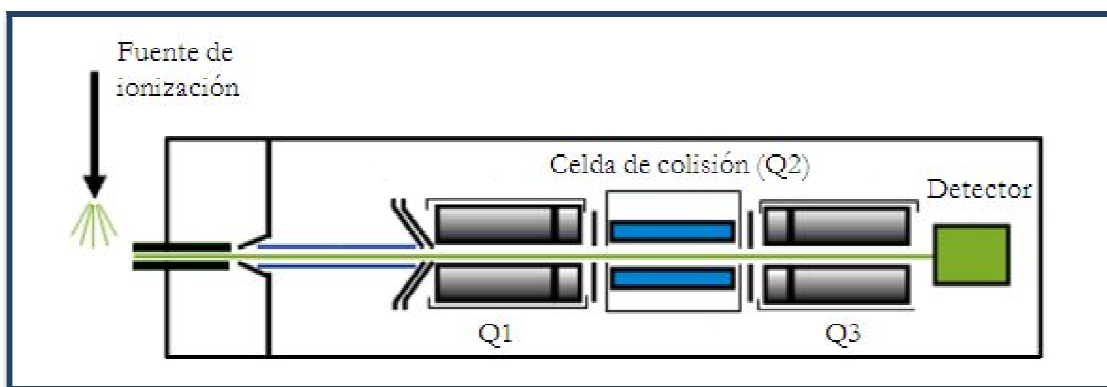


Figura 14. Esquema de un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo, (*Figura adaptada del manual de Agilent Technologies Inc.*).⁽²⁰⁰⁾

Los espectrómetros de masas con analizadores de triple cuadrupolo constituyen una poderosa herramienta en el caso de métodos de multi-residuo, debido a la elevada selectividad y sensibilidad que ofrecen. En general

presentan cuatro modos de operación: pérdida neutra, scan de iones producto, scan de iones precursores y monitorización de reacción sencilla, siendo éste último el más utilizado para el análisis de pesticidas cuando se está realizando búsqueda de compuestos objetivo.

El modo monitorización de reacción sencilla, también llamado SRM (Single Reaction Monitoring), o en el caso de que el número de analitos sea más de uno: “Monitorización de Reacción Múltiple” (MRM). Se basa en la selección del ión molecular de interés en Q1, posteriormente el ión molecular es enviado hacia la celda de colisión donde se fragmenta. A continuación Q3 selecciona un ión fragmento específico.⁽¹³⁰⁾

6.3.3.2. *Analizador de Tiempo de Vuelo (TOF)*

Es una poderosa herramienta para la identificación de compuestos no objetivo en matrices complejas debido a tres importantes características: en primer lugar, la capacidad de recopilar datos a través de una amplia gama de masas sin una disminución de la sensibilidad, en segundo lugar, la capacidad de diferenciar con alto poder de resolución, entre las señales correspondientes a las interferencias de las señales de interés, y en tercer lugar, la capacidad de medir la masa generando información de la composición elemental.⁽¹³⁰⁾

El principio de la espectrometría de masas de “tiempo de vuelo” está basado en la medida de la masa de las moléculas mediante medidas de relación m/z . Esta técnica permite la medida directa de una masa absoluta y la detección del ión con una gran sensibilidad. La masa es un atributo de cada molécula que permite identificar o confirmar la identidad de una molécula. Las medidas del peso molecular mediante espectrometría de masas están basadas en la producción, separación y detección de iones moleculares.⁽¹⁹⁵⁾

Una vez producida la ionización de la muestra, se retiene a los iones en la fuente iónica mediante un potencial de retardo de igual signo al de la carga de los iones. De esta forma se evita que los iones salgan de la fuente dispersos en el tiempo. Posteriormente se aplica un voltaje de extracción, consiguiendo que todos los iones salgan de la fuente simultáneamente. Éstos pasan por un campo electrostático acelerador con voltaje V , adquiriendo una elevada energía

cinética que les impulsa a través del tubo de vuelo o analizador, hacia el detector. Los iones llegan al detector a distinta velocidad en función de su relación m/z . Los iones más ligeros llegan antes al detector que los iones más pesados (**Figura 15 a y b**). La resolución es mayor cuanto más largo es el tubo de vuelo y menor es la dispersión de energías de los iones en la fuente.⁽¹⁹⁷⁾

Durante este proceso se mide el tiempo que tardan los iones en llegar al detector, el número de iones que llegan al detector en un tiempo dado es la abundancia o la intensidad de la señal. El tiempo de llegada es proporcional a la raíz cuadrada de las masas, y la relación viene definida por la **Ecuación 1**.

$$t = \left(\frac{s}{\sqrt{2eV}} \right) \times \sqrt{\frac{m_i}{z}}$$

Ecuación 1. Cálculo del tiempo que tardan los iones en llegar al detector.

Donde **t** es el tiempo de llegada de los iones, **s** es la distancia que recorren los iones, **m_i** es la masa (kg), **V** es el voltaje con el cual son acelerados y **z** es la carga del ión.⁽¹⁹⁷⁾

La masa de los iones es calculada en base a esta relación y para su aplicación es necesario un proceso de calibración continuo utilizando para ello como referencia un estándar de masa conocida, que permita obtener valores de masa exactos.⁽²⁰⁸⁾

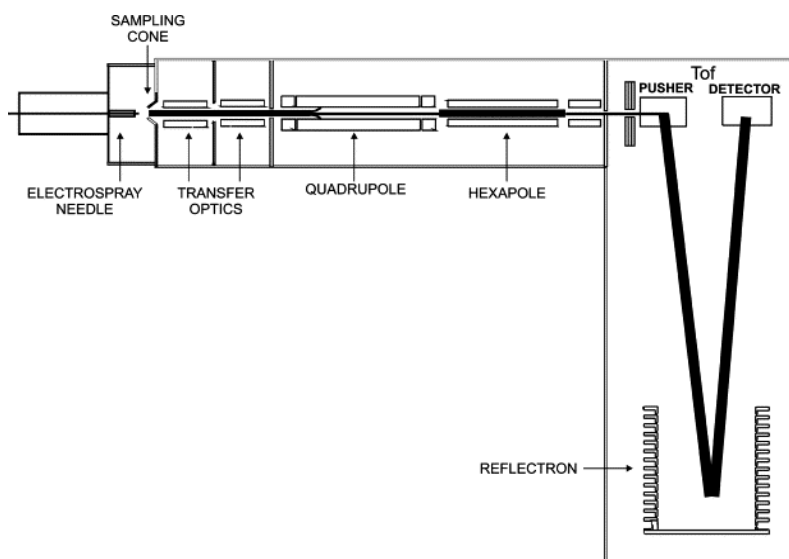
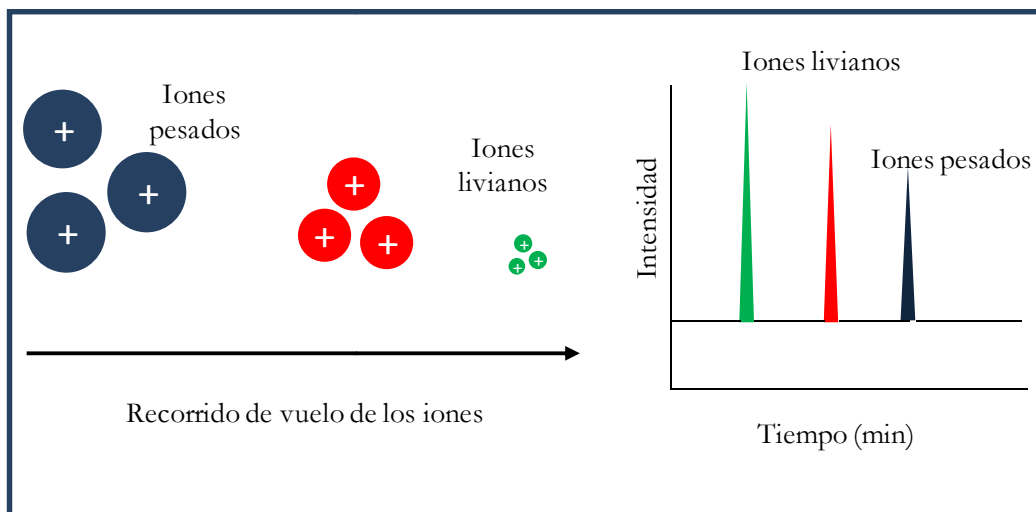


Figura 15 a. Principio del análisis del analizador de tiempo de vuelo. **b.** Representación esquemática del analizador.⁽²⁰⁹⁾

6.3.3.3. *Sistemas híbridos*

Combinan analizadores de diferente configuración, obteniendo considerables mejoras en cuanto a la información estructural que brindan y mejorando la sensibilidad que permite una mejor cuantificación.

6.3.3.3.1. LC-QLIT/MS

Este sistema combina la tecnología de los triple cuadrupolo con la trampa lineal de iones. La especificidad y cuantificación de los triples cuadrupolos combinada con la sensibilidad del “full scan” en MS/MS que aporta la trampa lineal de iones permite alcanzar niveles de detección acordes a los exigidos a nivel mundial.

El instrumento está basado en un QqQ en el cual Q_3 puede actuar como un cuadrupolo normal o en modo LIT.

El modo de funcionamiento consiste en que una vez generados los iones en la fuente de ionización, estos son guiados y enfocados hacia Q_1 , el cual actúa como filtro de masas (selecciona los iones precursores con una determinada m/z). Estos iones, son después enviados hacia Q_2 donde se promueve la activación de colisiones favoreciéndose la fragmentación de los iones precursores previamente seleccionados. Según el modo de uso los iones fragmento pueden ser direccionados hasta Q_3 , que actúa como filtro para “escanear” las masas de los iones fragmentos producidos (iones producto), en la celda de colisión cuando el sistema actúa en modo QqQ o en modo LIT los fragmentos pueden permanecer atrapados en el Q_3 en donde se aplica una rampa de potencial que dirige a los iones hacia el detector en el modo LIT.⁽²¹⁰⁾

La combinación de estos modos de trabajo en un único análisis es posible gracias al uso del modo IDA (Information–Dependent–Acquisition) provisto por el software del sistema, el cual permite, mediante diferentes modos de operación, la obtención de abundante información estructural de forma rápida y sencilla. El modo EPI (del inglés Enhanced Product Ion), es uno de los más utilizados. La **Figura 16** muestra un esquema general de las distintas partes del sistema.

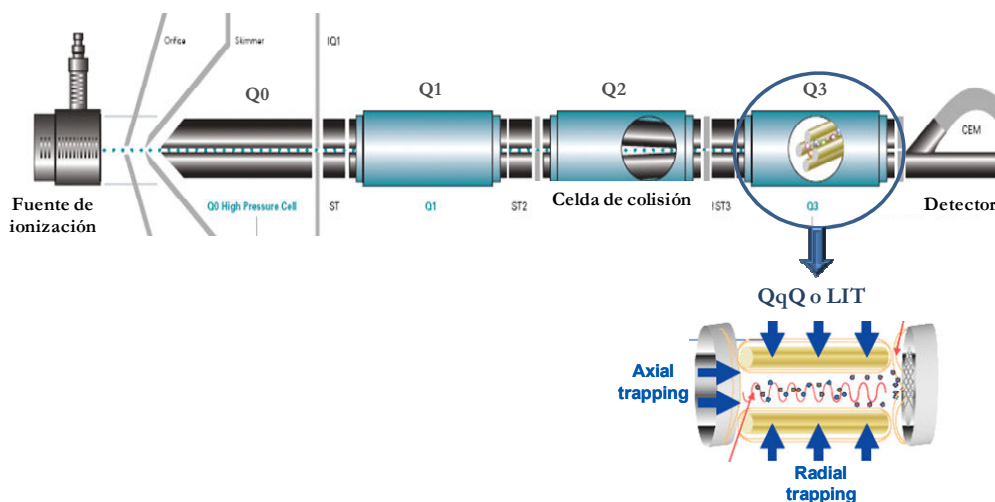


Figura 16: Principales partes del sistema QTRAP LC-MS/MS. (Figura adaptada de <http://notijenck.com.ar/?p=3038>).⁽²¹¹⁾

EPI: es un modo de operación de la trampa de iones, que permite obtener una alta calidad de espectros en *full scan*. El ion precursor seleccionado en Q1 es fragmentado en la celda de colisión por el CAD (Collisionally Activated Dissociation), y los iones fragmentos generados son capturados en la trampa de iones. Seguidamente son escaneados en una de las tres velocidades de scan o barrido que permite el equipo, dependiendo de la resolución requerida.⁽²¹²⁾ Este modo de trabajo es sumamente útil para aquellos compuestos en los que la segunda transición no se detecta o presenta una baja sensibilidad.^(213,214)

6.3.3.3.2. LC-QTOF/MS

El QqTOF consiste en un cuadrupolo y región de colisión adaptado de un instrumento triple cuadrupolo acoplado a un analizador tiempo de vuelo con aceleración ortogonal para MS^2 . Por consiguiente, el QqTOF tiene la capacidad de análisis de MS así como modos de operación en MS/MS. En modo MS/MS, el equipo selecciona un ión precursor en el Q1, lo fragmenta en la celda de colisión (Q2) y realiza el análisis de masas de los iones fragmento en el analizador TOF, proporcionando un espectro de masa exacta de iones producto en *full-scan*. La utilización de instrumentos QqTOF es todavía escasa, principalmente debido a su alto costo, sin embargo, la aplicación de esta

técnica se está extendiendo principalmente en técnicas de análisis medioambiental, que van dirigidas hacia la identificación de productos de degradación y transformación de los contaminantes orgánicos.⁽¹³⁰⁾

6.4. Aplicación de Técnicas Cromatográficas para el Análisis de Residuos de Pesticidas en Suelo, Agua y Arroz.

La **Tabla 17** resume las principales metodologías analíticas usadas para análisis de pesticidas en las matrices ambientales (agua y suelo) y matrices alimentarias, particularmente arroz blanco y arroz cáscara. Como se observa en la **Tabla 17**, la mayoría de los métodos reportados usan GC, particularmente GC-MS. La inyección “Splitless” (introducción de prácticamente toda la muestra) es la más comúnmente utilizada por su robustez, pero también otras formas de inyección como PTV (del inglés programmable temperature vaporizing) han sido reportadas.

Como se observa en la **Tabla 17** las principales aplicaciones reportadas para el análisis de pesticidas en arroz mediante LC-MS/MS utilizan la ionización mediante electrospray (ESI).

Analitos	Técnica instrumental	condiciones	Ref
Suelo			
24 pesticidas	GC-MS: splitless a 280 °C.	Columna: HP-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm). Columna: Zorbax SB-C18 (2,1 × 150 mm, 3,5 µm).	(171)
	LC-MS/MS: ESI positivo en modo SRM.	Fase móvil (FM): H ₂ O–MeOH, 90%–9,95% (v/v) con 0,05% HAc y H ₂ O–MeOH, 9,95%–90% (v/v) con 0,05% HAc en gradiente a 0,3 mL/min.	
6 carbamatos	LC con detector de fluorescencia y T. columna: 42 °C.	Columna: C-8 5 µm, (250 mm x 4,0 mm) con pre columna de C-8. F.M: MeOH y H ₂ O en gradiente.	(155)
15 pesticidas	GC-MS: modo SIM, splitless a 240 °C.	Columna: Rtx (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm).	(215)
14 fungicidas	GC-NPD/ECD: splitless a 270 °C.	Columna: HP-1 (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm).	(164)
	GC-MS: modo SIM, splitless a 250 °C.	Columna: HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm).	
16 herbicidas	LC-MS/MS: API modo negativo en MRM.	Columna: C-18 (250 × 4,6 mm, 5 µm). FM: ACN y 15 mmol/L de HAc en H ₂ O a 1 mL/min, seguido de Split	(216)

44 pesticidas	GC-MS: modo SIM, splitless a 250 °C.	para inyectar 0,2 mL/min a la fuente. Columna: HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm).	(217)
7 pesticidas	LC-DAD	Columna: Nucleosil 100-5 C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). FM: 5 mM buffer fosfato y ACN: H ₂ O (90:10) en gradiente.	(204)
10 sulfonilureas	LC-MS/MS: ESI modo positivo.	Columna: Zorbax XDB-C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm). FM: ACN y MeOH con 0,2% (v/v) HAc en gradiente a 0,75 mL/min.	(168)
36 pesticidas	GC-µECD en modo splitless entre 260 y 290 °C.	Columna: HP-5 (30 m x 0,32 mm d.i.; 0,25 µm).	(218)
34 pesticidas	GC-NPD y GC-MS: ionización EI a 70 eV, modo SIM, splitless.	Columna: HP-5MS1 (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm).	(166)
12 pesticidas	GC-MS/MS: PTV splitless hasta 260 °C, se mantiene 1,5 min y luego se cambia a split. LC-APCI/ ESI/MS en modo positivo.	Columna: BPX-5 (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm). Columna: Omnispher C-18 (150 mm x 3 mm d.i. 3 µm). FM: ACN y H ₂ O en gradiente a 0,4 mL/min	(219)
Agua			
82 pesticidas	GC-µECD/MS modo Split.	Columna: HP-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm).	(220)
12 pesticidas	LC-APCI/MS en modo negativo.	Columna: FM: ACN y formiato de amonio con 5 mM ácido fórmico a pH 3 en gradiente a 0,9 mL/min.	(181)
10 pesticidas	LC-MS/MS: ESI modo positivo.	Columna: Zorbax StableBond C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). FM: ACN y H ₂ O con 3 mM HAc y 3 mM NH ₄ CO OH (pH 3,7) a 1 mL/min	(221)
13 pesticidas	GC-MS: ionización EI a 70 eV, modo SIM.	Columna: DB17 ms (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,17 µm film	(222)
11 pesticidas	LC-MS/MS: ESI modo positivo y negativo.	Columna: Xterra MS C-18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5µm). FM: ACN y H ₂ O en gradiente a 0,25 mL/min. T. columna 40°C.	(223)
16 pesticidas	LC-MS/MS: ESI modo positivo en modo SIM programado (Scheduled).	Columna: Zorbax RX-C-8 (250 x 4,6 mm, 5 µm). Pre columna Zorbax XDB-C ₈ (12,5 x 4,6 mm, 5 µm). FM: 0,15% de HAc en H ₂ O y ACN en gradiente a 1,0 mL/min, y luego mediante split se introducen en la fuente 0,2 mL/min	(224)
44 pesticidas	GC-MS: ionización EI a 70 eV, modo SIM, splitless a 300 °C.	Columna: HP-5MSi (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm).	(152)
Arroz			
10 pesticidas	GC-MS: modo SIM, splitless a 220 °C.	Columna: DB-5 MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,5 µm).	(225)
13 herbicidas (fenoxiácidos)	UPLC-MS/MS: ESI modo positivo y negativo.	Columna: Acquity BEH C-18 (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm). FM: 0,1 % ácido fórmico en H ₂ O y 0,1% ácido fórmico	(146)

15 herbicidas (fenilureas)	HPLC-UV λ : 254 nm. HPLC detector de fluorescencia λ de excitación y emisión de 350 y 450 nm respectivamente.	en MeOH en gradiente a 0,2 mL/min. Columna: Zorbax XDB-C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Pre columna Zorbax XDB-C ₁₈ (12,5 x 4,6 mm, 5 μ m). FM: H ₂ O y ACN en gradiente a 0,75 mL/min.	(226)
18 pesticidas	LC-MS/MS: ESI modo positivo y negativo.	Columna: Wakosil-II C-18HG (150 mm x 2,0 mm, 3 μ m). FM: H ₂ O y ACN en gradiente a 0,2 mL/min	(227)
22 pesticidas	GC/ECD (1) GC/TSD (2): splitless a 250 °C.	Columna 1: DB-5 MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m). Columna 2: DB-1701 (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m).	(228), (188)
40 pesticidas	GC-MS, ionización EI a 70 eV, modo SIM, splitless.	Columna: HP 5MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m).	(189)
47 pesticidas	LC-QTRAP/MS: ESI positivo, en modo MRM.	Columna: Zorbax XDB-C ₁₈ (50 x 4.6 mm, 5 μ m). FM: H ₂ O y 5mM formiato de amonio en MeOH, pH 4 en gradiente a 0,2 mL/min,	(118)
62 pesticidas	GC-MS modo EI, PTV 8 μ L con gradiente de temperatura.	Columna: DB5-MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m).	(190), (150)
97 pesticidas	GC-MS: ionización EI a 70 eV, PTV con gradiente de temperatura.	Columna: RTX-5ms (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m).	(229), (230)
99 pesticidas	LC-MS/MS: ESI positivo, en MRM.	Columna: Ascentis C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 3 μ m). FM: H ₂ O y MeOH en gradiente a 0,2 mL/min,	(117)
109 pesticidas	GC-MS: ionización EI a 70 eV, splitless.	Columna: DB 5MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m).	(116), (187)
185/ 68 pesticidas	GCxGC/-TOF/MS: ionización EI a 70 eV, T. de la fuente: 250 °C, Full scan en el rango m/z 25-550, Inyección: directa de la muestra.	Columna: 1 ^{era} Rtx-5ms (20 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m), 2 ^{da} Rtx-pesticidas (1 m x 0,1 mm d.i., 0,1 μ m).	(157)
	UPLC-MS/MS: modo ESI positivo.	Columna: UPLC BEH C-18 (2,1 mm x 50 mm, 1,7 μ m). FM: 10 mM formiato de amonio en H ₂ O, pH 3 y 10 mM formiato de amonio en MeOH en gradiente a 0,45 mL/min.	
203 pesticidas	GC-MS: Ionización EI a 70 eV, T. de la fuente: 230 °C, splitless.	Columna: DB 5MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m).	(114)
	GC-MS: ionización EI a 70 eV, T. 230 °C, modo SIM, splitless.	Columna: DB 1701 (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m).	
405 pesticidas	LC-MS/MS: ESI positivo, MRM.	Columna: Atlantis dC ₁₈ (150 x 2,1 mm, 3 μ m). FM: H ₂ O y ACN en gradiente a 0,2 mL/min,	(231)

Tabla 17. Diferentes ejemplos de métodos cromatográficos para análisis de pesticidas en matrices del ecosistema del arroz.

7. Validación de Métodos Analíticos

7.1. *Parámetros de validación de métodos analíticos*

En un laboratorio de análisis la validación de un método se debe realizar para demostrar que este es apto para el propósito analítico para el cual se va a utilizar, o sea la validación asegura que los resultados analíticos arrojados por el método son confiables. La validación del método es una exigencia de los organismos de acreditación nacionales e internacionales y debe ser apoyada y extendida mediante la verificación del desempeño de dicho método durante los análisis de rutina. Todos los pasos involucrados en un método deben validarse. A nivel internacional, organismos tales como la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), International Standardization Organisation (ISO), *Codex Alimentarius* y Association of Official Analytical Chemists (AOAC) internacional han establecido guías para la validación de métodos analíticos. Las normas ISO definen a la validación como la confirmación mediante examen y provisión de evidencia objetiva de que las necesidades particulares para un uso específico previsto se cumplan.⁽²³²⁾

En la práctica, la validación de un método se realiza mediante la evaluación de una serie de características o parámetros de su performance tales como precisión, exactitud, selectividad/especificidad, linealidad, límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y robustez.⁽²³²⁾

La Unión Europea, por medio de la Dirección General de Sanidad y Protección del Consumidor (DG SANCO) establece criterios generales de validación de métodos y procedimientos de control de calidad en residuos de plaguicidas en alimentos y piensos, para los laboratorios oficiales que realizan el control o la vigilancia de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de animales por medio del Documento No. SANCO/12495/2011.⁽²³³⁾ Dicho documento incluye normas científicas aceptables para el análisis oficial de residuos de plaguicidas en la UE según lo acordado por todos sus Estados miembros y constituye una guía técnica que establece criterios específicos para la validación de procedimientos de control de calidad en relación con los métodos de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas. Por lo tanto, debe ser consultada en las auditorías y acreditaciones de los laboratorios oficiales que controlan residuos de plaguicidas de acuerdo con ISO/IEC 17025. El

Documento No. SANCO/12495/2011, además de establecer criterios para la validación de una metodología, también ofrece lineamientos acerca de cómo se debe realizar el transporte, muestreo y procesamiento de la muestra a ser analizada, preparación de estándares, métodos de extracción, confirmación de resultados, cuantificación y expresión de resultados.⁽²³³⁾

En general los métodos de análisis de residuos de pesticidas en alimentos se basan en los criterios establecidos por la DG SANCO. Los parámetros establecidos por la DG SANCO a ser evaluados para la validación de una metodología, se presentan a continuación.^(232,233)

Exactitud: se define como el grado de concordancia entre el resultado experimental y el valor de referencia aceptado (valor real).

Precisión: el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones establecidas.

Repetitividad: se define como la precisión (desviación estándar) de medición de un analito (por lo general obtenido de la recuperación o análisis de materiales de referencia), obtenidos utilizando el mismo método, en la misma muestra en un solo laboratorio en un corto período de tiempo durante el cual no existen diferencias en los métodos, analistas, materiales y/o equipos involucrados.

Reproducibilidad: se define como la precisión (desviación estándar) de medición de un analito (por lo general obtenido de la recuperación o análisis de materiales de referencia), obtenidos utilizando el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, ó durante un período de tiempo en el cual existan variaciones en los materiales y equipos. En el caso de que se evalúe en un mismo laboratorio se denomina reproducibilidad intra-laboratorio y se representa (W_R).

Precisión intermedia: es la precisión en condiciones donde los resultados de un ensayo se obtienen con el mismo método, en pruebas idénticas, en el mismo laboratorio, realizado por diferentes analistas utilizando diferentes equipos durante un periodo de tiempo prolongado.

Selectividad: La habilidad de la extracción, el clean-up, la derivatización, el sistema de separación y especialmente el detector de discriminar entre un analito y otro.

Especificidad: La habilidad del detector de dar señales que identifiquen el analito de forma efectiva.

Recuperación: la proporción de un analito remanente en el punto final de su determinación, luego de su adición, generalmente a una matriz blanco, inmediatamente antes de su extracción. Generalmente expresado como porcentaje.

Matriz blanco se define como una porción de muestra que se sabe que no contiene niveles detectables del analito en estudio.

Para llevar a cabo ensayos de recuperación generalmente se envenena (fortifica) la matriz blanco con los analitos de interés en al menos 2 niveles de concentración, el límite de reporte (o límite de detección, para comprobar la sensibilidad del método), y a un nivel más alto, tal vez un nivel de acción, por ejemplo, los LMR.

Límite de detección: es la concentración mínima del analito que puede ser determinada cuantitativamente con una precisión y veracidad adecuada.

Límite de cuantificación: se define como la mínima concentración o masa del analito que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión adecuada (media de recuperación para cada producto representativo en el rango de 70 a 120%, con una RSD $\leq 20\%$).

Para la estimación del LOD y del LOQ existen diferentes aproximaciones, una de las más utilizadas es utilizar la relación señal-ruido (S/N, del inglés signal-to-noise). De esta forma se considera que el LOD se corresponde con la concentración del analito que presenta una relación señal-ruido mayor o igual a 3 y el LOQ se corresponde con la concentración del analito para la cual se observa una relación señal-ruido mayor o igual a 10.⁽²³⁴⁾

Veracidad: se define como el grado de concordancia entre el valor promedio esperado y el valor de referencia aceptado (valor real). En el caso de existir materiales de referencia se expresa como el z-score, en ausencia de materiales de referencia se expresa como el porcentaje de recuperación.

Linealidad: la habilidad del método de obtener resultados experimentales (en un determinado rango) proporcionales a la concentración del analito.

Robustez: es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado por pequeñas y deliberadas variaciones en los

parámetros operacionales del método y que provee la seguridad de obtención de resultados confiables durante su normal ejecución.

Efecto Matriz (EM): Es la influencia de uno o más componentes de la muestra detectados durante la medición de la masa o concentración de un analito. La respuesta de ciertos analitos en algunos sistemas de determinación (por ejemplo, GC, LC-MS, ELISA) puede verse afectada por la presencia de compuestos co-extraídos de la muestra (matriz). A pesar de que el mecanismo exacto de supresión o aumento de la señal ocasionado por la matriz no se conoce exactamente se asume que los componentes de la matriz afectan el proceso de ionización en la interface API (aumentando o disminuyendo la cantidad de iones de analito formados).⁽²³⁵⁾

Estos efectos de la matriz derivan de procesos físicos y químicos originados durante la ionización, generalmente difíciles o imposibles de eliminar. Se observan como un aumento o disminución de la respuesta del detector, en comparación con la producida por soluciones de estándar de la sustancia analizada, en disolvente.

La presencia o ausencia de tales efectos puede ser demostrada por comparación de la respuesta producida por el compuesto analizado en solvente con la respuesta que se obtiene de la misma cantidad de analito en un extracto de la muestra. El efecto matriz tiende a ser variable e impredecible, aunque ciertas técnicas y sistemas (por ejemplo, HPLC-UV o de dilución de isótopos) son intrínsecamente menos propensos a presentar efecto matriz.

Algunas condiciones instrumentales como la fuente de ionización (APCI vs. ESI), el modo de ionización y el flujo de fase móvil también influyen en el efecto matriz.⁽²³⁶⁾

Existen algunas aproximaciones para tener en cuenta el efecto matriz. La más precisa sería la adición de estándares lo cual es sumamente inconveniente dado que el número de inyecciones por análisis aumentaría demasiado. En general el uso de estándar interno en análisis multi-residuo no es aconsejado ya que el efecto matriz depende en gran parte del analito. Un estándar interno ideal sería un estándar marcado isotópicamente, pero en general no están disponibles y los que existen tienen un costo elevado.⁽²³⁶⁾

La guía SANCO establece una posible práctica, a efectos de evitar este efecto matriz, que consiste en cuantificar mediante calibración en matrix-matched o calibración en matriz. La calibración mediante matrix-matched se basa en la adición de concentraciones conocidas de analito estándar a extractos de matriz blanco, extraídas usando el mismo método con el cual se extraen las muestras reales o las recuperaciones.

Es importante destacar que este tipo de calibración compensa el error que puede surgir durante la cuantificación de un analito pero no elimina el problema, ya que la causa es la variación en la intensidad de la respuesta observada y esta dependerá del tipo de matriz, de su concentración y del analito.^(236,237)

La DG SANCO establece que durante la validación de un método debe estudiarse el efecto matriz. En caso que se demuestre que existe efecto matriz entonces la cuantificación de los analitos deberá realizarse mediante matrix-matched, de lo contrario se podrá utilizar una curva de calibración en solvente.

Como se mencionó anteriormente el EM puede variar dependiendo de la matriz; esto ocasiona ciertos problemas para los laboratorios que hacen análisis de rutina de diferentes matrices, ya que deberían realizar una curva en matrix-matched para cada una de las matrices que evalúan, lo cual implica mucho tiempo de análisis. Para evitar esto la DG SANCO establece grupos de matrices representativas que pueden ser utilizadas para calibrar un rango más amplio de muestras. Por otro lado es importante recalcar que agencias federales como la Food and Drug Administration (FDA) y la EPA no permiten el uso de este tipo de calibración.⁽²³⁸⁾

En la práctica el efecto matriz se evalúa mediante la comparación de la pendiente de la curva de calibración de un analito en solvente y en matriz. Se calcula según la **Ecuación 2**:

$$\% \text{ EM} = \left[\left(\frac{\text{Pendiente de la curva en matrix-matched}}{\text{Pendiente de la curva en solvente}} \right) - 1 \right] \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo del Efecto Matriz.

Si el valor de % EM es igual a 100, no existe efecto matriz, un valor mayor o menor a 100 indica que existe efecto matriz, ya sea un aumento de la señal

(EM mayor que 100), o una supresión de la señal (EM menor que 100). Dependiendo del valor resultante algunos autores clasifican el efecto matriz en diferentes categorías, que son las que se utilizaron en este trabajo de tesis. Un porcentaje entre -20% y 20% se considera como que no existe EM, ya que esta variación se encuentra en un valor cercano a la repetitividad aceptada por el método. Un EM medio se observa cuando los valores se encuentran entre -50% y -20% ó 20% y 50%, mientras que si los valores son menores a -50% ó mayores que +50% el EM es pronunciado.^(239,240)

7.2. Criterios para la identificación y confirmación de residuos de pesticidas según DG SANCO

7.2.1. Requisitos en cromatografía

El tiempo de retención del analito en la muestra debe coincidir con el del estándar en la curva de calibración, ya sea en solvente o en matriz (en LC la tolerancia es de 2,5%, en GC la tolerancia es de 0,5%).

7.2.2. Requisitos en espectrometría de masas

La identificación depende de la selección de iones diagnóstico adecuados. Siempre que sea posible debe seleccionarse el ión molecular para realizar la identificación y confirmación del analito de interés. En general los iones m/z mayores que 100 presentan mayor seguridad como iones diagnóstico. Además los iones isotópicos, especialmente los de Cl o Br son particularmente útiles a la hora de la confirmación.

Los picos observados en los cromatogramas generados para cada analito deben presentar S/N mayor que 3, con tiempos de retención, forma de pico, y relación de las abundancias de iones que coincidan con el estándar utilizado para la calibración. El ion que presente la mayor intensidad debe ser utilizado para la cuantificación.

Además como la selectividad depende del detector, se deben seguir criterios de identificación determinados establecidos según el tipo de detector. En este trabajo se utilizó GC-MS y LC/MS/MS por lo que los criterios de identificación se indican en la **Tabla 18**.

Modo de MS	Detector de MS simple de resolución estándar	Detector de MS/MS
Sistema típico	Cuadrapolo, trampa de iones, tiempo de vuelo	Triple cuadrapolo, trampa de iones, sistemas híbridos (Q-TOF, QTRAP)
Requisito para la identificación	≥ 3 iones diagnóstico (preferiblemente el ion molecular)	≥ 2 iones fragmento

Tabla 18. Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de MS.

Otro criterio que se debe cumplir para la identificación es la relación de iones o de iones fragmento. La intensidad relativa de los iones detectados, expresada en % de intensidad del ión o fragmento más abundante, se debe corresponder con la del estándar en las mismas condiciones de concentración y medida. Las tolerancias se expresan en la **Tabla 19**.

Intensidad relativa	GC-MS (IE)	GC-MS (IQ), GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ
>50%	±10%	±20%
>20% a 50%	±15%	±25%
>10% a 20%	±20%	±30%
≤10%	±50%	±50%

Tabla 19. Tolerancias máximas aceptadas para las intensidades relativas de los iones según la técnica espectrométrica.

Por otro lado cuando se miden fragmentos de masa mediante técnicas que no son de full scan se debe seguir un sistema de identificación por puntos para asegurar una correcta interpretación de los datos. Según la Directiva 96/23/EC de la Unión Europea, las técnicas basadas en GC-MS requieren de 4 puntos de identificación, que corresponden a 3 iones fragmento y el tiempo de retención, mientras que las técnicas de LC-MS/MS requieren de 5 puntos de identificación; 2 iones precursores, cada uno con su ión fragmento y el tiempo de retención.⁽²⁴¹⁾

8. Degradación de Contaminantes Orgánicos en Agua Mediante Procesos de Oxidación Avanzados

8.1. Fotólisis

La degradación natural de contaminantes en agua es un área interesante de investigación y, en este sentido los procesos de foto-alteración con la luz del sol, es sabido que juegan un papel importante. Debido al gran uso de pesticidas en la agricultura, la búsqueda de metodologías que permitan reducir la cantidad de los residuos que pueden generarse en el ambiente es crucial. En este contexto el uso de metodologías de degradación química puede constituir una herramienta novedosa y útil pasible de ser aplicada en el campo de manera práctica. El principal problema de estas metodologías es que muchos contaminantes pueden degradarse a productos más tóxicos. Así pues, para conocer el destino medioambiental de los contaminantes es necesario tener información de los productos de degradación y así establecer posibles rutas de degradación.

8.2. Fotocatálisis solar

La polución del agua por el continuo aporte de contaminantes, como es el caso de los plaguicidas y sus metabolitos se ha convertido en los últimos años en un problema medioambiental realmente relevante a nivel mundial. En este contexto, para la remoción de contaminantes se han utilizado técnicas físicas tradicionales como la ósmosis reversa, adsorción sobre carbón activado o coagulación. Sin embargo estos métodos generalmente no eliminan la totalidad de los contaminantes, y muchas veces es necesario un post-tratamiento de forma de eliminar los adsorbentes o los residuos sólidos, aumentando el costo.⁽²⁴²⁾ En este sentido, en los últimos años, los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) han surgido como procesos eficaces y novedosos para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos orgánicos. Estos procesos se caracterizan por la generación de radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) libres, capaces de, a presión atmosférica y temperatura ambiente, oxidar y mineralizar la mayoría de los compuestos orgánicos, produciendo CO_2 e iones inorgánicos.⁽²⁴²⁾ Actualmente es bien sabido el elevado potencial de los PAO para el tratamiento de aguas conteniendo contaminantes persistentes, pero estos métodos son caros comparados con los procesos de bio-remediación.⁽²⁴³⁾

El costo principal de los PAO está relacionado con el uso de reactivos y consumo energético para la generación de radiación UV. Por ello, procesos como la fotocatalisis con TiO_2 o el foto-Fenton, fotocatalisis con Fe^{+2} , son de especial interés dado que pueden utilizar la radiación UV solar, en el rango UV-Vis, para generar los $\text{OH}^\bullet$.^(244,245) En este caso se aprovecha la energía solar como una forma económica y ambientalmente amigable, ya que la radiación solar es una fuente limpia de energía renovable.⁽²⁴²⁾

Estos procesos de fotocatalisis han demostrado ser procesos eficientes para la descontaminación de contaminantes orgánicos en agua, permitiendo la total mineralización de los mismos.⁽²⁴⁶⁾ Mediante la fotocatalisis se generan $\text{OH}^\bullet$, cuyo potencial de oxidación ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$) es mucho mayor que el de otros oxidantes tradicionales (ozono 2,07 V, agua oxigenada 1,78 V, cloro 1,36 V, etc.). Los $\text{OH}^\bullet$ son capaces de oxidar compuestos orgánicos principalmente por abstracción de hidrógeno o por adición electrofílica a los dobles enlaces, generándose radicales orgánicos libres ($\text{R}^\bullet$) que reaccionan a su vez con moléculas de oxígeno formando un peroxiradical, iniciándose una serie de reacciones de degradación oxidativa que pueden conducir a la completa mineralización del contaminante. Según Malato et al., la fotocatalisis solar, para aplicaciones relacionadas con el tratamiento de contaminantes y sustancias no biodegradables, es una tecnología que está en franca expansión.⁽²⁴⁷⁾

8.2.1. *Fotocatalisis heterogénea*

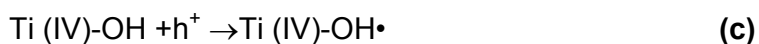
El término “fotocatalisis” implica la generación de especies catalíticas activas asistida por fotones. En el año 2002, la IUPAC propuso la actual definición de fotocatalisis, que en su acepción más simplista denota la aceleración de una fotorreacción por la acción de un catalizador. En ese contexto, terminológicamente se conceptúa la fotocatalisis heterogénea (FH) como la fotocatalisis que ocurre en el límite entre dos fases (sólido-líquido; sólido-gas; líquido-gas).⁽²⁴⁸⁾

En cuanto al proceso fotocatalítico heterogéneo clásico aplicado a la descontaminación de agua se puede considerar que globalmente éste está constituido por cinco etapas independientes: (i) transferencia de lo(s)

reactivo(s) de la fase acuosa a la superficie del catalizador, (ii) adsorción de por lo menos uno de los reactivos, (iii) reacción en la fase adsorbida (iv) desorción de los productos, (v) remoción de los productos de la región de interfase. La reacción fotocatalítica ocurre en la fase adsorbida (etapa iii). La principal diferencia de la FH en relación a la catálisis convencional es el modo de activación del catalizador, ya que se sustituye la activación térmica por una activación fotónica.

Cuando un semiconductor tal como óxidos (TiO_2 , ZnO , ZrO_2 , CeO_2), o sulfuros (CdS , ZnS) es irradiado por fotones con una energía igual o superior al ancho de banda del catalizador E_G (**Figura 17**), la absorción de estos fotones provoca el paso de un foto electrón (e^-) desde la banda de valencia hasta la banda de conducción, creando un foto hueco positivo en la banda de valencia (h^+), reacción **a** del **Esquema 1**. Tanto el foto hueco como el electrón (e^- y h^+) migran hacia la superficie de la partícula donde pueden participar en reacciones redox para generar diferentes productos. El foto electrón puede reducir al sustrato orgánico o reaccionar con aceptores de electrones como el O_2 adsorbido en la superficie del TiO_2 o el O_2 disuelto en agua, formando el radical superóxido ($\text{O}^{\bullet-}_2$), como se presenta en la reacción **b** del **Esquema 1**. Por otro lado los foto huecos positivos pueden oxidar a la molécula orgánica directamente o al H_2O y a los OH^- adsorbidos en el TiO_2 formando radicales $\text{OH}^\bullet$, reacciones **c-d** del **Esquema 1**. Tanto el e^- como el h^+ y los radicales serán los responsables de los procesos de foto-descomposición de los contaminantes, reacción **e** del **Esquema 1**.^(249,250,251)

La foto eficiencia suele ser disminuida por la recombinación del par electrón-hueco, la cual supone la disipación de parte de la energía fotoeléctrica en forma de calor.⁽²⁵²⁾



Esquema 1. Reacciones que ocurren en el proceso de fotocátalisis heterogénea.

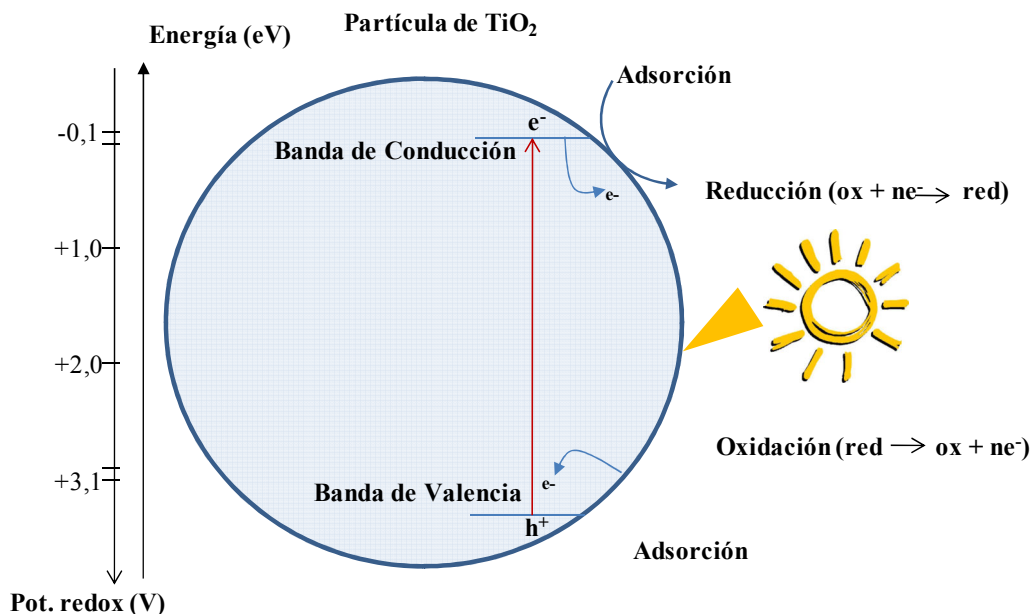


Figura 17. Representación esquemática del proceso de fotocátalisis heterogénea en una partícula de TiO_2 (Adaptada de Herrman et al., 1999).⁽²⁵²⁾

En la mayoría de los trabajos reportados de fotocátalisis en muestras de agua se utiliza el TiO_2 P25-Degussa como catalizador.⁽²⁵³⁾ El dióxido de titanio (TiO_2) a diferencia de otros catalizadores no es tóxico y es de bajo costo.⁽²⁵³⁾ Además tiene un ancho de banda-gap (separación energética que existe entre la banda de valencia y la de conducción) tal que los fotones con longitud de onda inferior a 387 nm tienen energía suficiente como para producir la excitación fotónica del mismo. Este hecho hace que la energía necesaria para excitar el catalizador pueda obtenerse de la luz solar.⁽²⁵³⁾ Otras características tales como su estabilidad térmica y química y sus fuertes propiedades mecánicas han favorecido su uso en reacciones fotocatalíticas para la descontaminación de agua. Una posible desventaja es que debido a su pequeño tamaño de partícula en conjunción con la gran área superficial tiende a aglomerarse durante su uso, en detrimento de una disminución del área superficial y de su re-utilización.⁽²⁵⁴⁾

8.2.2. Fotocátalisis homogénea

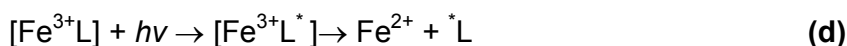
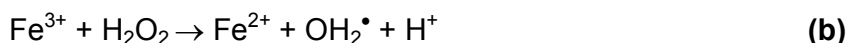
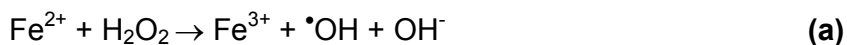
Según la IUPAC, la fotocatálisis homogénea es el proceso en que tanto el foto catalizador como las demás especies reactivas se encuentran en el mismo estado físico.⁽²⁴⁸⁾

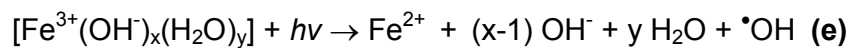
Dos ejemplos de fotocatálisis homogénea son los procesos Fenton y foto-Fenton (fF). Hasta ahora han sido poco reportados para la remediación de pesticidas, por lo que sólo se describirá su fundamento brevemente.

El proceso de Fenton consta principalmente de 2 etapas; la primera gobernada por radicales hidroxilo Y donde paralelamente, la luz favorece el pasaje de Fe^{2+} a Fe^{3+} , produciendo una cantidad relativamente alta de catalizador de Fenton en el medio de reacción. La velocidad de degradación es muy alta hasta que se agota el H_2O_2 . La segunda etapa ocurre en ausencia de radicales $\text{OH}^\bullet$ y es el resultado de la reacción fotoquímica, enlenteciendo enormemente la reacción.

Además, en el proceso Fenton las reacciones **a** y **b** son de reactivo limitante, por lo que una vez agotado el H_2O_2 , la reacción prácticamente se detiene. La regeneración de Fe^{2+} , reacción **b**, es mucho más lenta que la reacción inicial, reacción **a**. Al utilizar la radiación UV-Vis, se acelera la regeneración del Fe^{+2} a partir de diferentes complejos de hierro, donde L es un ligando orgánico, como se muestra en las reacciones **c-f** del **Esquema 2**.

Así el Fe^{2+} puede entonces reaccionar con el H_2O_2 .^(255,256) Los radicales hidroxilo reaccionan con los compuestos orgánicos, principalmente mediante abstracción de hidrógeno de los enlaces C-H, N-H u O-H, adición a enlaces C=C, adición electrofílica, por transferencia de electrones, o adición a anillos aromáticos.⁽²⁵⁷⁾ La abstracción de hidrógeno es el mecanismo de degradación más frecuente. La reacción **f** demuestra que se pueden generar radicales orgánicos ($\text{R}^\bullet$), los cuales pueden seguir oxidándose en presencia de H_2O_2 u oxígeno molecular (generando radicales hidroxilo o radicales peróxido, como se muestra en las reacciones **g-h** del **Esquema 2**. Esta serie de reacciones, conducen a la mineralización de los compuestos orgánicos.⁽²⁵⁸⁾





Esquema 2. Reacciones que ocurren en el proceso de fotocátalisis homogénea.

Comparado con otros procesos de fotocátalisis homogénea, la ventaja fundamental de Foto-Fenton es una mejor sensibilidad a la luz (necesita fotones a una $\lambda < 600 \text{ nm}$, que corresponde a un 35% de la radiación solar). Por otro lado, las desventajas son el bajo pH requerido (menor que 3, para evitar la precipitación de hidroxilos) y la necesidad de eliminar el hierro después de la reacción.

9. Objetivos Generales.

1. Evaluación de la presencia de residuos de agroquímicos en el ecosistema agrícola del arroz en Uruguay, considerando: suelo, agua y grano de arroz como las matrices representativas de dicho ecosistema.
2. Estudio de la presencia y distribución de residuos de pesticidas desde la siembra hasta el procesamiento del grano en los diferentes productos: arroz paddy, arroz cargo, arroz blanco y los subproductos: arroz medio grano y afrechillo.
3. Evaluación de la posibilidad del uso de métodos de oxidación avanzada para la remediación de pesticidas persistentes, utilizados en el cultivo de arroz en nuestro país.

9.1. Objetivos específicos.

- 1.1. Desarrollo de metodologías analíticas multi-residuo para cada una de las matrices representativas: agua, suelo y grano de arroz que permitan determinar simultáneamente los pesticidas utilizados en el cultivo de arroz.
 - 1.1.1. Optimización de parámetros instrumentales para el estudio de los analitos de interés.
 - 1.1.2. Desarrollo y comparación de las diferentes metodologías de extracción y clean-up evaluadas.
 - 1.1.3. Validación de las metodologías seleccionadas para suelo, agua y grano de arroz.
 - 1.1.4. Aplicación de estas metodologías al análisis de residuos de pesticidas en muestras reales de las tres matrices seleccionadas.
- 2.1. Diseño de un experimento a campo en condiciones controladas y aislado, para evaluar la distribución de pesticidas durante la producción de arroz.

2.2. Ajuste y validación de las metodologías analíticas necesarias para la evaluación de los productos generados durante el proceso industrial de obtención del grano de arroz.

2.3. Análisis de las muestras reales obtenidas durante el experimento diseñado.

3.1. Estudio de la aplicabilidad de los procesos de oxidación avanzada para la remediación química de agua de cultivo de arroz contaminada; tomando como modelo el herbicida quinclorac.

3.2. Elucidación de los productos de descomposición del quinclorac obtenidos a partir de los procesos de oxidación avanzada.

3.3. Propuesta de una ruta de degradación para este herbicida.

Experimental

10. Materiales y Métodos

10.1. Materiales y Reactivos

-Estándares:

-Estándares de pesticidas de pureza en el rango 94,1% y 99,5%, adquiridos a Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania) y Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania).

-¹³C-Cafeína y trifenil fosfato (TPP), suministrados por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania).

-Nicotina d₃, adquirida a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

-Pesticidas comerciales.

-*Herbicidas*: Propanil 480 (propanil), Byspiriné (bispiribac sodio), Exocet (quinclorac) y Cibecol (clomazone) de Cibeles S.A. (Montevideo, Uruguay).

-*Fungicidas*: Amistar (azoxistrobín) de Syngenta, Ipetec 40CE (isoprotilane), Agrizim 500 (carbendazím), Convect 250 EC (difenoconazol) y Punch 75 WG (triciclazol) de Agritec (Montevideo, Uruguay), Nativo 300SC (trifloxistrobín) de Bayer Cropscience (Montevideo, Uruguay), Allegro (kresoxim-metil + epoxiconazol) de BASF (Bs. As. Argentina), y Bucaner 430F (tebuconazol) de Cibeles.

-*Insecticidas*: Engeo 247 (tiamectoxam + λ cihalotrina) de Syngenta (Santiago de Chile, Chile).

-Solventes.

-Acetonitrilo (ACN), Metanol (MeOH), Acetona, Acetato de etilo (AcOEt) calidad HPLC, suministrados por Pharmco (Brookfield, CT, USA), Baker (Phillipsburg, NJ, USA), y Aldrich (St. Louis, MO, USA).

-Agua tipo 1 (ASTM I) con una resistencia específica de 18 M Ω , obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Direct QTM 5 Ultrapure Water System de Millipore (Milford, MA, USA).

-Ácidos.

-Acido fosfórico (H_3PO_4 , pureza 85 %), ácido acético (HAc pureza 98%), y ácido fórmico (pureza 98%), adquiridos a Fluka-Sigma Aldrich (Steinhein, Alemania). Acido sulfúrico, de Panreac (Barcelona, España).

-Sales.

-Acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) y carbonato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, suministrados por Fluka-Sigma Aldrich (Steinhein, Alemania).

-Acetato de sodio trihidratado ($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnesio (MgSO_4) y sulfato de sodio (Na_2SO_4) adquiridos a J.T. Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). El MgSO_4 fue calcinado en mufla durante 5 h a 500°C de forma de eliminar los ftalatos y el agua residual.

-Cloruro de sodio (NaCl) e hidróxido de amonio fueron suministrados por Panreac Química S.A (Barcelona, España).

-Citrato de sodio di-hidratado proporcionado por J.T Baker (Deventer, Países Bajos).

-Citrato de sodio dibásico sequihidratado, suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y por Macherey Nagel (Duren, Alemania).

-Sorbentes.

-Carbón activado, carbono grafitizado (GCB) y Amina primaria y secundaria (PSA) suministrados por SUPELCO (Bellefonte, PA, USA).

-C-18, de $40\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de partícula adquirido en Varian (Palo alto, CA, USA).

-Otros.

-Sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemania).

-Cartuchos de extracción de C-18 Bakerbond® (40 mm, 500 mg) obtenidos de J.T. Baker (Deventer, Países Bajos).

-Cartuchos conteniendo una resina polimérica, Oasis® HLB (30 mm, 200 mg, 6 mL) adquiridos en Waters (Milford, MA, USA).

-Filtros de teflón de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ obtenidos de Millipore (Milford, MA, USA).

-Filtros de membrana de vidrio de 0,70 μm adquiridos en Teknokroma (Barcelona, España).

-Filtros de membrana de vidrio de 0,22 μm adquiridos en Millipore (Milford, MA, USA).

-TiO₂ P-25 (80% anatasa y 20% rutilo), con un área superficial de entre 51 y 55 m²/g procedente de Degussa (Frankfurt, Alemania)

10.2. Instrumental

10.2.1. Equipos de cromatografía líquida

-HPLC serie 1050 de Hewlett Packard (HP), (Avondale, PA, USA) equipado con:

- Bomba cuaternaria
- Inyector automático
- Detector de arreglo de diodos, (**Figura 18**).



Figura 18. Equipo de LC-DAD utilizado en el análisis de herbicidas de post-emergencia.

-Columna cromatográfica ULTRA C-18, de 150 x 4,6 mm d.i. y 5 μm de tamaño de partícula de Restek Corp., (Bellefonte, PA, USA) equipada con una pre-columna ULTRA C-18, de 4,0 x 10 mm d.i. y 5 μm de tamaño de partícula de Restek Corp., (Bellefonte, PA, USA).

Experimental

-HPLC modelo Agilent 1200 de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) equipado con:

- Desgasificador.
- Inyector automático.
- Bomba binaria.

-Columna cromatográfica C-8 (Agilent Zorbax Eclipse XDB) de 150 × 4,6 mm d.i. y 5 µm de tamaño de partícula.

-Detector de masas TripleQuad LC/MS modelo 6410 de Agilent Technologies con una interfase de electrospray (ESI), (**Figura 19**).



Figura 19. Equipo de HPLC-QqQ/MS utilizado en el análisis de pesticidas.

-HPLC Agilent serie 1100, de Agilent Technologies, equipado con:

- Desgasificador.
- Inyector automático.
- Bomba binaria.

-Columna cromatográfica XDB-C-18 de 50 mm × 4,6 mm d.i. y 1,8 µm de tamaño de partícula de Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA).

-Detector de masas Agilent MSD TOF de Agilent Technologies, (Palo Alto, CA, USA) con una interfase de electrospray (ESI), (**Figura 20**).



Figura 20. Equipo de HPLC-TOF/MS utilizado para el análisis de pesticidas en full scan.

-HPLC Agilent serie 1200, de Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA) equipado con:

- Inyector automático.
- Bomba binaria.

-Columna cromatográfica C-8 Zorbax Eclipse XDB, 150 mm × 4,5 mm d.i. y 5 μ m de tamaño de partícula de Agilent Technologies.

-Detector de masas modelo 5500 QTRAP[®] de AB Sciex Instruments, (Foster city, CA, USA), equipado con una Fuente TurboV[™], (**Figura 21**).

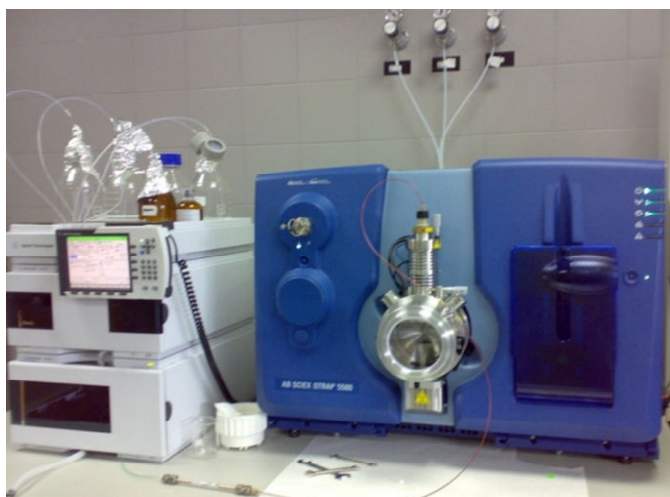


Figura 21. LC-QLIT/MS utilizado para el análisis de pesticidas.

-HPLC Agilent serie 1200, de Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA) equipado con:

- Desgasificador.
- Inyector automático.
- Bomba binaria.

- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-C18 de 50 mm x 4,6 mm d.i. y 1,8 μm de tamaño de partícula de Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA).

- Detector de masas modelo Agilent 6530 Series Accurate Mass QTOFMS, de Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA) equipado con una fuente de ionización de electrospray con Jet Stream, (**Figura 22**).



Figura 22. LC-QTOF/MS utilizado para el monitoreo de quinclorac y sus productos de transformación.

10.2.2. Equipos de cromatografía gaseosa (GC-MS)

-GC modelo HP 6890 de Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA), equipado con:

Experimental

-Inyector automático modelo 7683.

-Columna cromatográfica: columna capilar HP-5 (5% difenil y 95% dimetilsiloxano) de 25 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espesor de film) de Agilent Technologies, (Waldbronn, Alemania).

-El GC acoplado con un espectrómetro de masa modelo HP 5973 de Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA), (**Figura 23**).



Figura 23. GC-MS utilizado para el análisis de pesticidas.

10.3. Equipos

-Molinos

- Molino modelo F100, SAMAP (Andolsheim, Francia).
- Molino polymix, Kinematica AG, (Bohemia, NY, USA).

-Agitadores:

- Vortex modelo SA8, Stuart (Staffordshire, UK).
- Plancha agitadora CB162, Stuart (Staffordshire, UK).
- Shaker SSL1, Stuart (Staffordshire, UK).
- Baño de ultrasonido: Transsonic 460, Elma (Singen, Alemania).
- Extractor axial automático AGYTAX® Cirta Lab. S.L. (Madrid, España).

-Equipos utilizados para la evaporación de solventes

- Rotaevaporador a vacío modelo R 114 equipado con un baño de agua modelo B480, de Büchi (Flawil, Suiza).
- Evaporador Turbo-Vap modelo LV de Zymark (Hopkinton, MA, USA).
- Generador de nitrógeno y aire, modelo NK-500 del Instituto de Química Industrial de Shandong (Shandong, China).

-Equipos varios

- Sistema de agua ultrapura, Direct QTM 5 Ultrapure Water System de Millipore (Bedford, MA, USA).
- Balanza BP 2105, Sartorius (Göttingen, Alemania).
- Balanza trebuchette PS/C1 de Radwag, (Randon, Polonia).
- Centrífuga IEC HN-SII, velocidad máx. 9000 r.p.m., International Equipment Company (Chattanooga, TN, USA).
- pHímetro pHmeter 240, Richmond Scientific (Lancashire, UK).
- Liofilizador Alpha 1-4, de Martin Christ (Osterode am Harz, Alemania).
- Equipo de concentración de muestras a vacío para SPE, Manifold Visiprep[™] de Supelco (Bellefonte, PA, USA).
- Analizador de carbono orgánico total, modelo TOC-5050A, equipado con un muestreador modelo ASI-5000a, Shimadzu (Columbia, MD, USA).
- Suntest CPS+ de Atlas Material Testing Technology (Chicago, IL, USA).
- Recipiente de vidrio borosilicatado de 1000 mL con camisa refrigerante, Schott (Düsseldorf, Alemania).

10.4. Preparación de soluciones stock

Las soluciones stock (madre) de los pesticidas se prepararon mediante la pesada de una masa de aproximadamente 10 mg de forma exacta que fueron disueltos en 10,0 mL de ACN o MeOH, según las diferentes solubilidades de los compuestos a analizar, resultando en una solución de concentración 1000 mg/L para cada uno de los pesticidas estudiados. Estas soluciones fueron almacenadas a una temperatura de -20 °C.

A partir de estas soluciones se prepararon las soluciones de trabajo de 100,0 mg/L en ACN, las cuales también fueron almacenadas a -20 °C. De estas soluciones se prepararon diluciones para obtener soluciones mix, en un rango

de concentraciones desde 0,5 µg/L hasta 10,0 mg/L, dependiendo del destino. Estas soluciones fueron utilizadas tanto para la fortificación de las diferentes matrices con el fin de realizar los estudios de recuperación como para la preparación de las correspondientes curvas de calibración.

10.5. Métodos Cromatográficos para Análisis de Residuos de Pesticidas

10.5.1. Análisis de herbicidas en LC-DAD (método A)

La determinación de residuos de pesticidas se realizó mediante un HPLC HP de la serie 1050. Los analitos de interés fueron separados en una columna analítica ULTRA C-18, equipada con una pre-columna ULTRA C-18.

Se utilizó una fase móvil (FM) de ACN (A) y agua ajustada a pH 3 (B) (el pH del agua se ajustó con H_3PO_4 al 50%) en gradiente comenzando con un 48% de FM A estable durante 12 min seguido por un gradiente lineal hasta 80% FM A en 1 min, mantenido constante durante 20 min, (**Figura 24**). Por último se llevó a las condiciones iniciales y se dejó equilibrar 5 min. El flujo utilizado fue 1 mL/min hasta los 12 min y posteriormente 1,2 mL/min hasta el final del análisis. El volumen de inyección fue: 20 μL .

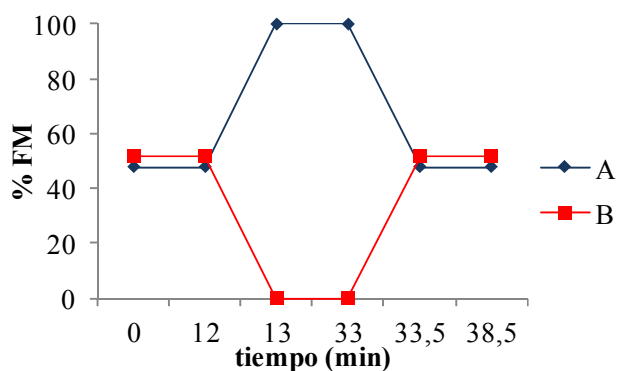
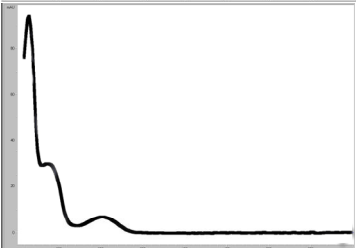
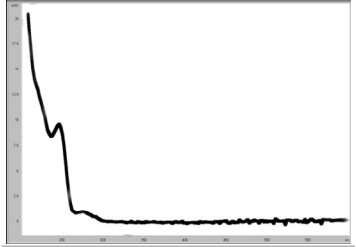
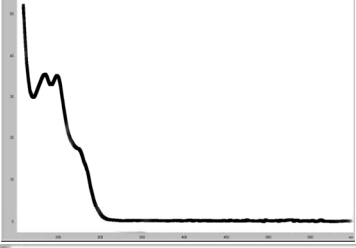
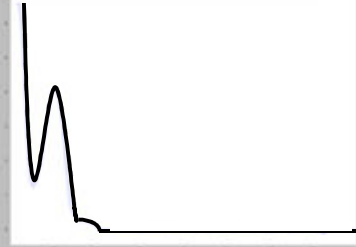
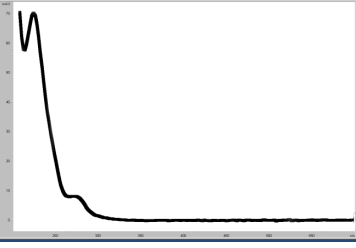


Figura 24. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de herbicidas de post-emergencia mediante LC-DAD.

Las longitudes de onda seleccionadas los tiempos de retención (t_R) y el espectro UV correspondiente se presentan en la **Tabla 20**. Los análisis fueron realizados a temperatura ambiente.

Herbicida	t _R (min)	λ (nm)	Espectro UV
Bensulfurón-metil	7,2	235	
Bentazone	5,8	220	
Bispiribac sodio	8,6	247	
Cihalofof-butíl	17,5	235	
Clomazone	8,5	220	
Metsulfurón-metil	3,8	220	

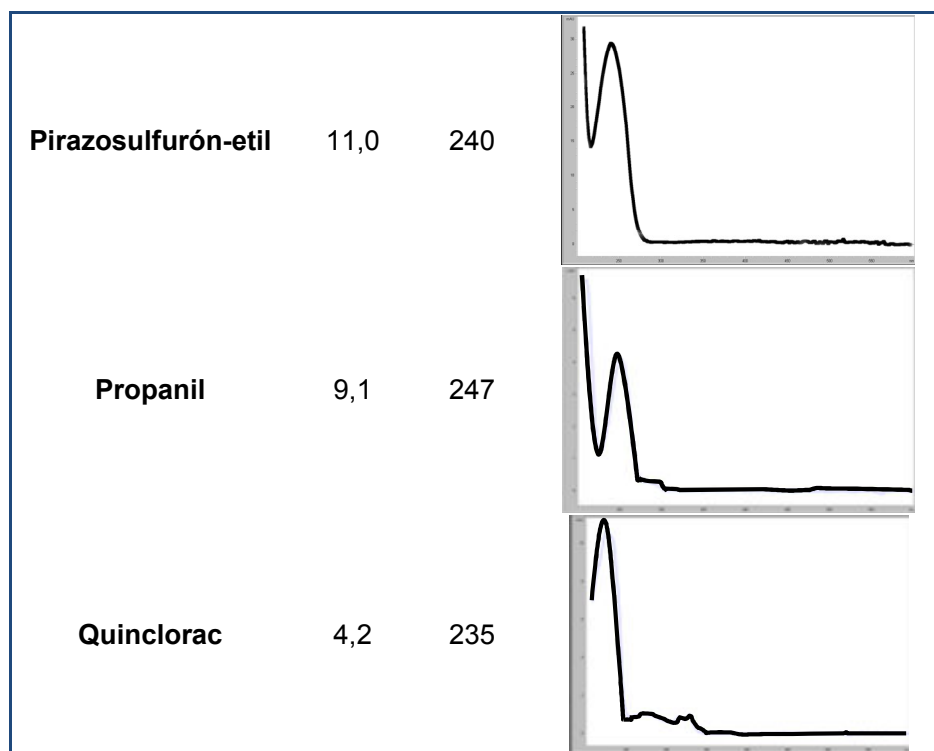


Tabla 20. Longitudes de onda utilizadas, espectros de absorción, y tiempos de retención obtenidos durante el análisis de herbicidas de post-emergencia mediante LC-DAD

10.5.2. *Análisis de residuos de pesticidas mediante LC-QqQ/MS (método B)*

La determinación de residuos de pesticidas fue desarrollada en un HPLC modelo Agilent 1200 (**Figura 19**). La separación de los analitos de interés se realizó con una columna de XDB C-8. La FM C fue una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1% y FM D fue ACN.

Las determinaciones se realizaron en el modo positivo y negativo.

Modo positivo

El programa de gradiente comienza en 20% de D, durante 3 min, aumentando de forma lineal hasta 100% D en 30 min por 3 min. Posteriormente se vuelve a condiciones iniciales dejando equilibrar 12 min, (**Figura 25**).

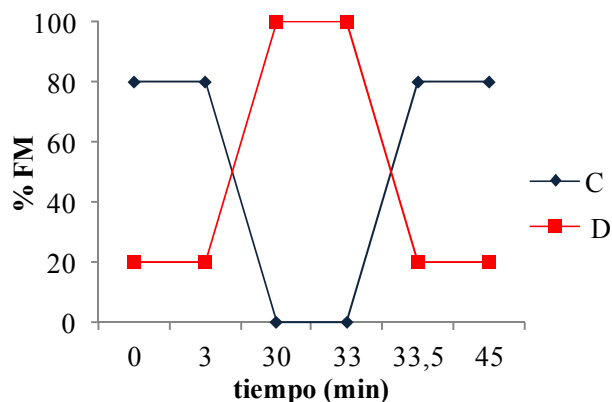


Figura 25. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI positivo.

Modo Negativo

El gradiente comienza con 50% de D, constante por 3 min, seguido de un gradiente lineal hasta 100% en 6 min, constante durante 3 min. Posteriormente se vuelve a las condiciones iniciales dejando equilibrar durante 5 min, (**Figura 26**).

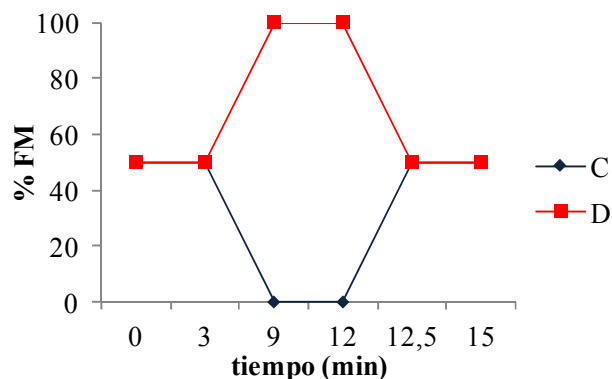


Figura 26. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI negativo.

El flujo de fase móvil utilizado fue de 0,6 mL/min en ambos métodos y se inyectaron 10 μ L de muestra en todos los casos. Los análisis fueron realizados a temperatura ambiente.

El análisis mediante espectrometría de masas se llevó a cabo en un TripleQuad LC/MS modelo 6410. La fuente de ionización (ESI) operó en modo positivo y

negativo bajo los siguientes parámetros: Temperatura de Gas 300 °C; flujo de gas: 9 L/min; gas nebulizador: 40 psi y voltaje del capilar: ± 4000 V. El gas nebulizador y el de colisión fue N_2 .

Los tiempos de inicio del primer y segundo segmento en modo positivo fueron 0 y 18,2 minutos, respectivamente. En el modo negativo se utilizó un solo segmento.

La optimización de los compuestos, es decir la selección de las condiciones del voltaje de fragmentación y energías de colisión se determinaron individualmente para cada pesticida. Para ello se prepararon soluciones patrón individuales de 10 mg/L en ACN y agua 1:1 (v/v) y se introdujeron directamente a la fuente de ionización mediante el sistema FIA (del inglés, Flow Injection Analysis), que consiste en la introducción de los estándares directamente a la fuente, sin el paso previo por la columna cromatográfica (sistema de inyección de flujo directo).

Se inyectó cada pesticida a cuatro voltajes de fragmentación diferentes (60, 90, 120, 150 V) y se seleccionó el óptimo para aislar el ión precursor deseado (generalmente $[M+H]^+$ ó $[M+Na]^+$ para modo positivo y $[M-H]^-$, para el modo negativo. Una vez optimizado el ión precursor se determinaron las energías de colisión (CE) de los iones producto o fragmento. Para esto se trabajó al voltaje de fragmentación determinado en el paso anterior y se inyectaron nuevamente cada uno de los pesticidas a 4 CE diferentes (10, 15, 20 y 25 eV). De esta forma se seleccionaron aquellas 2 CE con las cuales se obtuviera el ión fragmento más abundante. En algunos casos, a los valores fijados de voltaje de fragmentación y energías de colisión, no se obtuvo la fragmentación adecuada del compuesto para obtener el ión precursor o sus fragmentos, por lo que fue necesario usar otros valores de estos parámetros. Estos valores se encuentran detallados en la **Tabla 21** y **Tabla 22**, junto con los tiempos de retención y las transiciones utilizadas para la identificación y cuantificación de los pesticidas analizados mediante LC-QqQ/MS. El software utilizado para el desarrollo de los métodos y la adquisición de datos fue el Agilent Mass Hunter Data Acquisition; Qualitative Analysis and Quantitative Analysis software.

Experimental

Pesticida	Modo de acción	t _R (min)	Cuantificación SRM1	Confirmación SRM2	Voltaje de Fragmentación (V)	CE 1 (V)	CE 2 (V)
Modo Positivo							
Azimsulfurón	Herbicida	17,3	447,1 / 178,1,	425,0 / 182,1	120 / 90	10	15
Azoxistrobín	Fungicida	21,1	404,0 / 372,0	404,0 / 344,0	120	10	20
Bensulfurón-metil	Herbicida	18,7	411,1 / 182,0	411,1 / 149,0	150	20	15
Bispiribac sodio	Herbicida	19,2	453,1 / 297,1	453,1 / 179,1	150	15	20
Bromacilo	Herbicida	14,2	261,0 / 205,0	261,0 / 188,0	90	10	20
Carbaril	Regulador de Crecimiento / Insecticida	17,2	202,0 / 145,0	202,0 / 127,0	140	10	20
Carbendazím	Fungicida	3,4	192,0 / 160,0	192,0 / 132,0	150	15	20
Carbofurán	Insecticida	16,6	222,0 / 123,0	222,0 / 165,0	90	20	10
Cihalofop-butil	Herbicida	10,4	357,8 / 256,0	357,8 / 302,0	150 / 165	40	12
Clomazone	Herbicida	19,4	240,1 / 125,0	240,1 / 89,0	150	20	60
Difenoconazol	Fungicida	23,7 pico doble	406,0 / 251,0	406,0 / 337,0	120	20	15
Diazinón	Acaricida / Insecticida	25,3	305,0 / 169,0	305,0 / 153,0	120	15	20
Diflubenzurón	Insecticida	22,1	311,0 / 158,0	311,0 / 141,0	120	10	20
Dimetoato	Acaricida / Insecticida	11,2	230,0 / 199,0	230,0 / 171,0	90	5	10
Edifenfos	Fungicida	23,3	311,0 / 173,0	311,0 / 283,1	120	5	10
Epoxiconazol	Fungicida	21,0	330,1 / 123,1	330,1 / 121,1	120	10	15
Etiofencarb	Insecticida	17,8	226,0 / 107,0	226,0 / 164,0	60	15	5
Fluroxipir	Herbicida	14,5	255,0 / 181,0	255,0 / 209,0	120	20	15
Flutolanil	Fungicida	23,0	324,1 / 262,1	324,1 / 242,1	150	15	20
Imazapic	Herbicida	9,6	276,1 / 163,2	276,1 / 145,0	150	30	40
Imazapir	Herbicida	6,5	262,1 / 149,1	262,1 / 217,0	150	30	30
Imazaquín	Herbicida	14,3	312,1 / 199,0	312,1 / 153,2	90/150	30	50
Imazosulfurón	Herbicida	18,6	413,1 / 156,0	413,1 / 153,0	150	20	5
Imidacloprid	Insecticida	10,3	256,0 / 175,0	256,0 / 209,0	90	15	15
Iprodiona	Fungicida	22,7	330,0 / 245,0	330,0 / 101,0	90	15	20
Kresoxim-metil	Fungicida	24,2	336,2 / 246,2	336,2 / 229,2	150	15	20
Malatión	Acaricida / Insecticida	23,0	331,0 / 99,0	331,0 / 127,0	90	20	10

Experimental

Metsulfurón-metil	Herbicida	15,7	382,1 / 167,1	382,1 / 141,1	150	15	15
Molinato	Herbicida	21,4	188,2 / 126,1	188,2 / 55,1	80	10	20
Oxidemetón metil	Insecticida	4,1	246,9 / 125,0	246,9 / 169,0	80	20	10
Picoxistrobín	Fungicida	24,5	368,1 / 205,2	368,1 / 145,1	80	5	20
Pirimifós-metil	Acaricida / Insecticida	25,3	306,2 / 164,2	306,2 / 108,2	150	20	20
Piraclostrobín	Fungicida	24,7	388,1 / 194,1	388,1 / 163,0	120	5	20
Pirazosulfurón-etil	Herbicida	20,3	415,1 / 182,1	415,1 / 139,1	120 / 90	25	50
Piridafentión	Acaricida / Insecticida	21,7	341,0 / 189,0	341,0 / 205,0	120	20	20
Procloraz	Fungicida	19,5	376,0 / 308,0	376,0 / 266,0	90	10	15
Propaquizafop	Herbicida	26,3	444,1 / 371,1	444,1 / 100,1	140	15	15
Propiconazol	Fungicida	23,1	342,1 / 159,1	342,1 / 69,3	120	20	15
Quinclorac	Herbicida	14,4	242,0 / 223,0	242,0 / 161,0	90	10	40
Quinoxifen	Fungicida	25,9	308,1 / 196,9	308,1 / 271,9	150	35	25
Spiroxamina	Fungicida	16,2	298,0 / 144,0	298,0 / 100,0	120	20	20
Tebuconazol	Fungicida	21,7	308,0 / 70,0	308,0 / 125,0	90	20	20
Tebufenozide	Insecticida	23,7	353,2 / 133,1	353,2 / 296,9	150	15	5
Temefós	Insecticida	27,5	467,1 / 419,0	467,1 / 405,0	150	15	10
Tiacloprid	Insecticida	13,3	253,0 / 126,0	253,0 / 186,0	120	20	10
Tiametoxam	Insecticida	7,6	292,0 / 211,0	292,0 / 181,0	90	10	20
Tiofanato-etil	Fungicida	18,9	371,1 / 151,1	371,1 / 325,1	90	20	10
Triadimefón	Fungicida	21,6	294,2 / 197,1	294,2 / 225,0	150	10	10
Triadimenol	Fungicida	19,5 y 19,9	296,2 / 70,2	296,2 / 227,0	60	10	5
Triciclazol	Fungicida	11,5	190,1 / 163,0	190,1 / 136,0	150	20	25
Trifloxistrobín	Fungicida	26,4	409,2 / 186,2	409,2 / 206,2	120	20	10
Triflumizol	Fungicida	22,9	346,0 / 278,0	346,0 / 73,0	90	5	10
Triflumurón	Insecticida	24,1	359,0 / 156,0	359,0 / 139,0	120	15	20
2,4-D	Herbicida/ Regulador de Crecimiento	8,0	220,8 / 162,9	218,9 / 160,9	90	5	15
3,4-Dicloroanilina	Metabolito	18,8	162,0 / 144,9	162,0 / 127,0	150	20	20
TPP	Surrogate St.	24,6	327,0 / 77,2	327,0 / 152,2	120	35	30
Modo negativo							
Azimsulfurón	Herbicida	7,5	423,0 / 214,1	423,0 / 135,1	150	10	27

Experimental

Bensulfurón-metil	Herbicida	8,3	409,1 / 195,8	409,1 / 154,1	120	40	40
Bentazone	Herbicida	7,9	239,1 / 197,0	239,1 / 132,0	120	15	20
Bromacilo	Herbicida	6,2	261,2 / 205,0	261,2 / 188,0	150	15	15
Imazosulfurón	Herbicida	8,2	410,9 / 229,9	410,9 / 153,9	120	15	20
Propanil	Herbicida	9,1	218,0 / 161,8	216,0 / 159,9	120	10	15

Tabla 21. Modo de acción y parámetros operacionales optimizados para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS para arroz blanco, arroz paddy y agua de cultivos de arroz en modo ESI positivo y negativo; tiempos de retención, transiciones de cuantificación y de confirmación, voltaje de fragmentación y energías de colisión.

Experimental

Pesticida	Modo de acción	t _R (min)	Cuantificación SRM1	Confirmación SRM2	Voltaje de Fragmentación (V)	CE 1 (V)	CE 2 (V)
Modo Positivo							
Bendiocarb	Insecticida	16,5	224,0/167,0	224,0/109,0	90	5	15
Ciproconazol	Fungicida	20,1	292,0/125,0	292,0/70,0	120	20	20
Clorotolurón	Herbicida	16,6	213,0/140,0	213,0/72,0	120	20	20
Difenoxturón	Herbicida	17,7	287,0/123,0	287,0/72,0	90	20	20
Dietofencarb	Fungicida	20,5	268,2/226,2	268,2/180,2	90	5	15
Diurón	Herbicida	17,6	233,0/160,0	233,0/72,0	120	20	20
Fenobucarb	Insecticida	20,4	208,1/152,1	208,1/95,0	90	5	10
Fenurón	Herbicida	10,3	165,0/120,0	165,0/72,0	90	15	20
Hexaconazol	Fungicida	22,2	314,2/159,0	314,2/70,2	120	20	20
Isoprotiolane	Fungicida/Regulador de Crecimiento	22,7	291,1/231,0	291,1/189,1	90	5	15
Isoprocarb	Insecticida	18,7	194,1/152,0	194,1/95,1	90	5	15
Isoproturón	Herbicida	17,5	207,0/165,0	207,0/72,0	120	10	20
Pirimicarb	Insecticida	7,3	239,2/182,1	239,2/72,2	150	15	20
Promecarb	Insecticida	21,1	208,0/151,0	208,0/109,0	60	5	15
Teflubenzurón	Insecticida	25,3	381,0/158,0	381,0/141,0	90	20	20
Tetraconazol	Fungicida	21,8	371,8/158,9	371,8/70,2	150	20	15
Tiodicarb	Insecticida	15,6	355,1/163,1/88,2	355,1/108,1	60	5/15	10
Modo Negativo							
Dicamba	Herbicida	7,04	221,0/176,8	218,8/174,6	40	2	2

Tabla 22. Modo de acción y parámetros operacionales optimizados para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en arroz paddy en modo ESI positivo y negativo; tiempos de retención, transiciones de cuantificación y de confirmación, voltaje de fragmentación y energías de colisión.

10.5.3. Método cromatográfico para el análisis del efecto matriz mediante LC-TOF/MS (método C)

Se utilizó un HPLC serie 1100, de Agilent, (**Figura 20**). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna XDB-C-18. La fase móvil, E y F fueron: agua/ACN (95:5) (v/v) con un 0,1% de ácido fórmico y ACN/agua (95:5) (v/v) con 0,1% de ácido fórmico. El procedimiento cromatográfico fue: 10% de F constante durante 1 min, seguido por un gradiente lineal hasta 100% de F en 12 min y constante durante 5 min a 100% (**Figura 27**). El flujo de fase móvil fue 0,6 mL/ min. El volumen de inyección fue 20 μ L de muestra en todos los casos. Los análisis fueron realizados a temperatura ambiente.

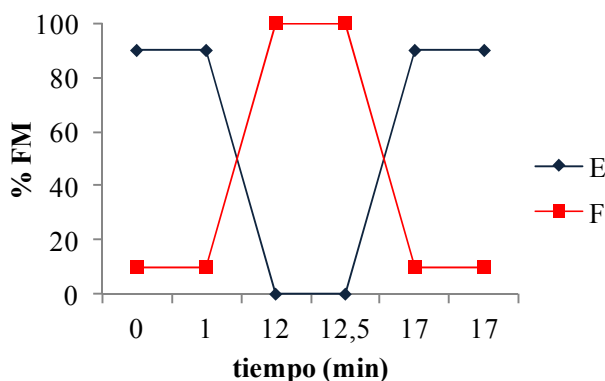


Figura 27. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-TOF/MS en modo ESI positivo.

El detector de masas de tiempo de vuelo (TOF) utilizado fue un Agilent MSD TOF con una interfase de electrospray (ESI).

Las condiciones de operación de la fuente en modo ESI positivo fueron: voltaje del skimmer 60 V; octapolo rf 250 V; temperatura del gas 300 °C; gas de arrastre 9 L/min; nebulizador 40 psig; voltaje del capilar 4000 V. Se trabajó con un voltaje de fragmentación de 190 V.

El registro de la masa exacta se realizó en el rango de 50 a 1000 m/z, y los datos se obtuvieron a través de los software Analyst QS Applied Biosystems / MDS – SCIEX (Frankfurt, Alemania) con aplicaciones específicas adicionales introducidas por Agilent MSD TOF en el software MassHunter Workstation de Agilent Technologies (USA).

Este equipo se mantiene calibrado automáticamente, a partir de una solución de calibración proporcionada por el fabricante, que contiene la masa de referencia de purina ($C_5H_4N_4$ de m/z 121,05009) y HP-0921 ([hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno], ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$) con m/z 922,009)). El instrumento provee una resolución típica de 9700 ± 500 (m/z 922,0098).

10.5.4. Método cromatográfico para el análisis de residuos de pesticidas mediante LC-QLIT/MS (método D)

El análisis de los compuestos de interés se desarrolló en un HPLC modelo 1200 de Agilent acoplado con un sistema híbrido de un triple cuadrupolo y trampa de iones lineal en tándem, modelo 5500 QTRAP®, (**Figura 21**). Se utilizó una fuente TurboV™ en modo positivo y negativo. La separación cromatográfica se realizó con una columna cromatográfica de fase reversa, C-8. La fase móvil, G y H, fueron: ACN y 0,1% de ácido fórmico en agua respectivamente.

El método desarrollado en modo positivo fue 10% G inalterado durante 1 min, aumento lineal hasta 100% G en 15 min, constante durante 10 min y posteriormente a las condiciones iniciales en 0,1 min, constante durante 10 min, (**Figura 28**).

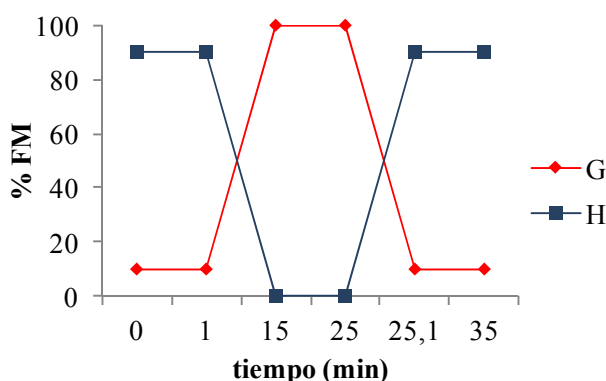


Figura 28. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QLIT/MS en modo ESI positivo.

El programa de gradiente usado en modo negativo fue: 20% de G por 50 s, se aumentó el % de G hasta 100% en 5 min manteniéndose constante durante 5 min, y posteriormente a las condiciones iniciales en 0,1 min dejando re

equilibrar la columna 5 min, (**Figura 29**). El volumen de inyección fue 5 μL y el flujo de la fase móvil de 0,6 mL/min en ambos modos. Los análisis fueron realizados a temperatura ambiente.

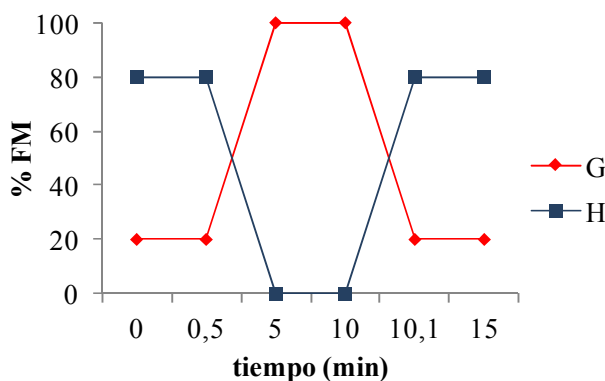


Figura 29. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QLIT/MS en modo ESI negativo.

Los parámetros de operación de la fuente fueron los siguientes: voltaje de ionización, 5000/-3500 V; gas cortina, 20 (unidades arbitrarias); La presión de GS1 y GS2 fue de 50 psi; y la temperatura del gas probe, 500 °C. Se utilizó N_2 como gas nebulizador y de colisión en ambos modos. La calibración de los cuadrupolos se realiza automáticamente con una solución de 5-10 M de poli-propilenglicol, introducida mediante una jeringa conectada a la interfase.

La optimización de los compuestos, es decir la selección de las condiciones del voltaje de fragmentación y energías de colisión se realizó individualmente para cada pesticida. Para ello se prepararon soluciones patrón, individuales, de 1 mg/L en MeOH y se inyectaron mediante el sistema FIA. La metodología de optimización en este caso es diferente que en el caso del LC-QqQ/MS. Una vez inyectada la solución estándar del pesticida, el equipo busca la mejor combinación de voltaje de fragmentación (DP)/ión precursor. A continuación se realiza un barrido en full scan al DP establecido para buscar los iones fragmento más abundantes (se eligen 2) con sus correspondientes CE. Otros dos parámetros, el potencial de entrada y el potencial de salida de la celda de colisión también son optimizados, aunque en general se aplica un valor fijo para todos los pesticidas incluidos en el método. Los parámetros optimizados para cada uno de los pesticidas analizados mediante este sistema se

encuentran detallados en la **Tabla 23**, junto con los tiempos de retención y las transiciones utilizadas para su identificación y cuantificación. La transición más intensa fue la seleccionada para la cuantificación, mientras que la más débil se utilizó para la identificación de los pesticidas de interés.

El software utilizado para el procesamiento y adquisición de datos fue el Applied Biosystems /MDS Sciex Analysis.

10.5.4.1. Condiciones del modo IDA (Information-Dependent-Acquisition)

El scan mediante EPI fue diseñado con un Q1 en baja resolución y la trampa lineal de iones escaneando en un rango desde 50 a 270 amu a una velocidad de 10000 amu/s. La CE, el DP y el EP usados en el modo EPI fueron de 30 eV, 65 V y 10 V respectivamente. El tiempo total del ciclo SRM-IDA-EPI fue de 1,19 s.

Por otro lado se prepararon soluciones de quinclorac estándar en MeOH de 1 y 10 µg/L, y fueron analizadas con el método EPI. El espectro obtenido fue almacenado en la biblioteca de espectros a la CE seleccionada. Dichos espectros fueron utilizados para la comparación con los espectros obtenidos de las muestras reales y de las fortificadas.

Experimental

Pesticida	Modo de acción	t _R	Cuantificación	Confirmación	DP (V)	CE1 (V)	CE2 (V)
			SRM1	SRM2			
Modo Positivo							
Azimsulfurón	Herbicida	12,7	425,0/182,1	425,0/243,7	100	29	28
Azoxistrobín	Fungicida	14,4	404,2/372,0	404,2/343,9	100	21	33
Bendiocarb	Insecticida	12,6	223,7/166,9	223,7/109,0	100	13	27
Bensulfurón-metil	Herbicida	13,3	411,2/182,2	411,2/148,9	117	29	30
Bispiribac sodio	Herbicida	13,5	431,2/274,9	431,2/413,1	205	21	28
Carbaril	Regulador de Crecimiento / Insecticida	12,8	202,1/145,0	202,1/127,1	130	16	43
Carbendazím	Fungicida	6,7	192,0/160,1	192,0/132,0	200	27	41
Carbofurán	Insecticida	12,6	222,0/165,1	222,0/123,1	91	18	31
Cihalofof-butil	Herbicida	16,9	357,8/256,0	357,8/302,2	117	17	10
Ciproconazol	Fungicida	14,1	292,1/70,1	292,1/125,0	170	58	44
Clomazone	Herbicida	13,7	240,7/125,0	240,7/85,0	80	30	34
Clorotolurón	Herbicida	10,5	214,0/72,1	214,0/140,8	87	32	19
Diazinón	Acaricida / Insecticida	16,7	304,6/169,0	304,6/153,1	100	30	27
Dietofencarb	Fungicida	14,3	268,0/226,1	268,0/180,1	76	14	23
Difenoconazol	Fungicida	15,8	405,9/250,9	405,9/337,0	100	36	24
Difenofoxurón	Herbicida	12,8	287,0/72,0	287,0/123,3	150	23	25
Diflubenzurón	Insecticida	15,0	310,8/158,1	310,8/141,1	115	19	47
Dimetoato	Acaricida / Insecticida	10,2	230,0/199,1	230,0/171,2	60	15	20
Diurón	Herbicida	13,0	233,0/72,0	233,0/160,0	64	22	35
Edifenfos	Fungicida	15,6	311,0/283,0	311,0/173,0	160	17	25
Epoxiconazol	Fungicida	14,4	331,0/121,0	331,0/141,1	185	30	28
Etiofencarb	Insecticida	13,2	226,1/107,0	226,1/164,1	60	28	11
Fenobucarb	Insecticida	14,4	208,1/94,9	208,1/152,1	94	25	12
Fenurón	Herbicida	9,8	165,1/72,0	165,1/120,0	40	26	24
Flufenoxurón	Herbicida	17,3	489,2/158,1	489,2/140,6	165	32	62
Fluroxipir	Herbicida	14,7	255,0/208,8	255,0/237,0	135	22	16
Flutolanil	Fungicida	15,3	323,9/261,8	323,9/282,2	120	23	20

Experimental

Hexaconazol	Fungicida	15,2	314,3/69,9	314,3/245,0	180	69	23
Imazapic	Herbicida	9,5	276,1/231,0	276,1/163,0	240	25	36
Imazapir	Herbicida	8,5	262,9/218,1	262,9/235,0	150	28	22
Imazaquín	Herbicida	11,4	312,0/267,0	312,0/198,9	245	28	36
Imazetabenz-metil	Herbicida	10,1	289,1/229,0	289,1/257,1	280	28	24
Imazosulfurón	Herbicida	13,3	413,1/156,1	413,1/231,9	120	31	24
Imidacloprid	Insecticida	9,9	256,0/175,1	256,0/209,1	118	27	35
Isoprocarb	Insecticida	13,6	194,0/94,9	194,0/152,1	60	18	11
Isoproturón	Herbicida	12,9	207,1/72,0	207,1/165,1	70	27	19
Iprodiona	Fungicida	15,3	330,0/244,8	330,0/288,0	165	22	22
Kresoxim-metil	Fungicida	15,9	314,0/206,1	314,0/266,9	76	12	8
Malatión	Acaricida / Insecticida	15,4	331,3/127,0	331,3/99,0	52	19	37
Metsulfurón-metil	Herbicida	11,9	382,2/166,7	382,2/141,0	100	19	35
Molinato	Herbicida	15,1	188,0/125,9	188,0/97,8	130	23	48
Oxidemetón-metil	Insecticida	7,4	247,0/168,8	247,0/104,9	140	16	16
Picoxistrobín	Fungicida	15,8	368,2/205,2	368,2/145,0	80	13	30
Piraclostrobín	Fungicida	16,2	388,2/193,7	388,2/295,9	50	16	20
Pirazosulfurón-etil	Herbicida	14,1	415,2/182,1	415,2/369,1	44	19	19
Piridafentión	Acaricida / Insecticida	14,8	341,0/189,1	341,0/205,0	100	36	36
Pirimicarb	Insecticida	8,3	238,7/72,1	238,7/182,2	50	38	23
Pirimifós-metil	Acaricida / Insecticida	16,8	306,1/108	306,1/164,1	110	42	28
Promecarb	Insecticida	14,7	208,1/151,1	208,1/109,0	80	14	23
Propafós	Insecticida	15,5	304,8/221,0	304,8/263,0	90	19	10
Propaquizafop	Herbicida	16,9	443,7/100,0	443,7/371,1	115	20	19
Propiconazol	Fungicida	15,5	342,2/159,0	342,2/187,0	110	51	25
Propoxur	Insecticida	12,5	210,0/168,1	210,0/111,2	60	9	12
Quinoxifen	Fungicida	17,1	309,1/197,9	309,1/272,9	100	40	40
Quinclorac	Herbicida	11,6	242,0/224,0	---	50	21	--
Spiroxamina	Fungicida	11,2	298,1/144,0	298,1/100,1	240	25	47
Tebuconazol	Fungicida	14,8	308,1/70,1	308,1/125,1	80	60	57

Experimental

Tebufenozide	Insecticida	15,7	353,4/296,7	353,4/133,2	60	10	23
Temefós	Insecticida	17,3	467,1/404,7	467,1/418,8	190	25	26
Tetraconazol	Fungicida	14,7	372,0/159,0	372,0/70,0	110	43	65
Tiacloprid	Insecticida	11,0	253,0/125,9	253,0/186,0	110	34	19
Tiametoxam	Insecticida	8,9	292,1/210,9	292,1/246,1	60	19	14
Tiodicarb	Insecticida	11,6	355,1/87,9	355,1/163,2	160	29	11
Tiofanato-etil	Fungicida	13,4	371,0/282,0	371,0/324,8	60	15	13
Triazofós	Acaricida / Insecticida	13,3	314,1/162,1	314,1/286,0	120	25	16
Triciclazol	Fungicida	10,0	190,1/163,1	190,1/136,1	210	31	40
Triadimefón	Fungicida	14,8	294,0/197,1	294,0/224,9	180	20	20
Triadimenol	Fungicida	13,9	296,1/70,0	296,1/227,1	50	40	14
Trifloxistrobín	Fungicida	16,9	409,2/185,7	409,2/206,0	150	25	20
Triflumizol	Fungicida	15,5	346,2/278,2	346,2/72,9	100	15	21
Triflumurón	Insecticida	15,8	359,0/156,2	359,0/138,8	40	27	42
Nicotina d₃	Surrogate estándar	2,3	163,1/117,0	166,0/130,0	125	35	27
Modo Negativo							
2,4-D	Herbicida	7,5	220,7/162,8	218,7/160,8	110	15	34
Bentazone	Herbicida	7,6	238,8/175,2	238,8/197,1	250	28	29
Fipronil	Insecticida	8,4	437,1/331,0	437,1/319,1	100	24	32
Propanil	Herbicida	7,9	216,9/160,8	216,9/125,0	110	23	33
Teflubenzurón	Fungicida	8,7	379,0/339,0	379,0/359,0	110	16	10

Tabla 23. Modo de acción y parámetros optimizados para el análisis de pesticidas mediante LC-QLIT/MS en modo positivo y negativo; tiempos de retención, transiciones de cuantificación y de confirmación, DP; declustering potential (V), CE; Energía de Colisión (eV) y CXP; Potencial de salida de la celda de colisión (5 V).

10.5.5. Análisis de quinclorac y sus productos de transformación luego de la remediación química mediante LC-QTOF/MS (método E)

Los analitos fueron separados en un HPLC serie 1200 de Agilent, **Figura 22**. Se utilizó una columna XDB C-18. La fase móvil consistió en 0,1% de ácido fórmico y 5% de agua ultra pura en ACN (I) y 0,1% de ácido fórmico en agua (pH 3,5) (J). El método cromatográfico se comenzó con un 10% de I, constante por 1 min, seguido de un gradiente lineal hasta 100% en 12 min y mantenido constante durante 5 min. Por último se volvió a las condiciones iniciales y se dejó equilibrar durante de 7 min para comenzar un nuevo análisis, (**Figura 30**). El flujo de fase móvil aplicado fue de 0,6 mL/min y el volumen de inyección de 20 μ L. En estas condiciones el tiempo de retención del quinclorac fue de 7,5 min y su LOQ de 4,0 μ g/L.

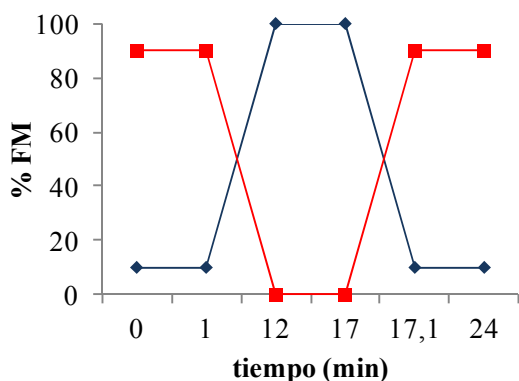


Figura 30. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de quinclorac y sus productos de degradación mediante LC-QTOF/MS.

Los análisis para el monitoreo de quinclorac y la búsqueda de sus productos de degradación fueron desarrollados en un equipo de cromatografía líquida híbrido acoplado a espectrometría de masas en tándem, utilizando un cuadrupolo acoplado a un TOF como analizador serie 6530 Accurate Mass QTOFMS de Agilent

Los iones fueron generados usando una fuente de ionización de electrospray con Jet Stream, en modo positivo, trabajando con un flujo de N_2 super calentado de 12 L/min a 400 °C. El voltaje del capilar fue de 4000 V; la presión del nebulizador 60 psi; el flujo de gas secante 5 L/min; la temperatura del gas,

250 °C; el voltaje del skimmer 65 V; el voltaje de fragmentación en la fuente de 90 V.

El rango de m/z se calibró usando una solución de referencia en el rango m/z 60–950 suministrada por Agilent. Una segunda solución de referencia conteniendo purina (m/z 121,0509) y HP-921 (m/z 922,0098) se usó como calibrante continuo en el modo positivo. Se trabajó en modo alta resolución a 4 GHz. Para HP-921, la resolución del instrumento en estas condiciones fue 21700 ± 500 . Los espectros obtenidos mediante MS/MS fueron adquiridos en el rango de m/z 40-950 aplicando una energía de colisión de entre 5-30 eV para cada compuesto. El software utilizado para el desarrollo de los métodos y la adquisición de datos fue el Agilent MassHunter Workstation (versión B.03.01).

10.5.6. *Análisis de pesticidas en GC-MS (método F)*

Para los análisis realizados mediante GC–MS se utilizó un cromatógrafo HP 6890 GC acoplado con un espectrómetro de masa modelo HP 5973, (**Figura 23**). La separación de los analitos de interés se realizó en una columna capilar HP-5 de 25 m x 0,25 mm d.i. y 0,25 μm de espesor de film. Los espectros de masas fueron obtenidos mediante impacto electrónico a 70 eV en modo SIM como se indica en la **Tabla 24**. La temperatura del inyector fue de 280 °C y la de la interfase 250 °C. Se utilizó He como gas carrier a 38 cm/s (1 mL/min). El gradiente de temperatura fue: temperatura inicial de 120 °C constante durante 5 min, aumentando linealmente hasta 285 °C a 5 °C/min, manteniéndose constante durante 3 min. El volumen de inyección fue de 1,0 μL en modo splitless.

La optimización de los compuestos se realizó a partir de la inyección de cada uno de los pesticidas de interés en una concentración de 10 mg/L en AcOEt en modo full scan. Se seleccionaron 3 iones, el más abundante se utilizó para la cuantificación mientras que los otros dos fueron para la confirmación.

La identificación de los compuestos de interés se realizó a partir de la comparación del tiempo de retención y concordancia del espectro de masas entre el analito problema y una inyección de pesticida estándar. Además de la verificación de los espectros de interés con la librería de referencia del

software. La cuantificación de los compuestos fue llevada a cabo con un estándar interno, TPP a una concentración de 1mg/mL, a partir del cálculo del factor de respuesta.

Pesticida	t _R (min)	Iones seleccionados m/z (Abundancia relativa) ^a
Difenoconazol	35,8	323(100), 265(72), 325(62)
Kresoxim-metil	24,0	116 (100), 131(47), 206(54)
λ-cihalotrina	30,2	181(100), 197(77), 208(36)
Trifloxistrobín	26,4	116(100), 131(63), 145(24)
TPP	26,9	326(100), 325(78), 327(19)

Tabla 24. Tiempo de retención e iones utilizados para la determinación de pesticidas mediante GC-MS.

10.6. Muestreo

Uruguay

El muestreo de suelo se realizó previo a la aplicación de agroquímicos y en el momento de la cosecha. Las muestras de suelo fueron extraídas en 3 profundidades dependiendo de la zona; 0-10 cm en Rocha, Cerro Largo, Treinta y Tres y Artigas, y de 0-20 y de 20-40 cm en el departamento de Salto. El pH, la composición y textura se los suelos fueron determinados por Facultad de Agronomía.

Para la realización del muestreo de agua se siguieron 2 criterios diferentes; en Rocha, Cerro Largo, Treinta y Tres y Artigas, para cada ciclo del cultivo, se realizaron 4 muestreos de agua en los siguientes momentos: previo a la primera aplicación de productos, al inicio del riego (aproximadamente 45 días post siembra), al finalizar el mismo y en el momento de la cosecha. Además se realizaron un total de 6 muestreos en los ríos Cebollatí y Olimar, antes del comienzo de la zafra (julio) y un muestreo mensual durante el período comprendido entre diciembre y abril (2006-2007). El muestreo en la chacra se realizó a la entrada y salida de ésta. En Salto el muestreo de agua se realizó en la zona correspondiente a la cuenca del arroyo Tala. En esta zona, para cada ciclo de cultivo se realizó un muestreo en cada estación del año. Se tomaron muestras de agua en tres puntos diferentes de cada curso de agua y las tres

muestras se mezclaron de forma de lograr una muestra representativa de cada punto.

En total se realizaron un total de 16 muestreos durante 2007-2011.

En la **Tabla 25 a y b** se indican los momentos de la toma de muestra y los diferentes puntos de muestreo se esquematizan en la **Figura 31**.

El muestreo de grano se realizó en el momento de la cosecha.

Nº muestreo	Fecha	Estación	Puntos
1	Agosto 2007	Invierno	Naciente Tala
			Naciente Cerrito
			Tala entre Juncal y Sarandí
			Desembocadura Sarandí
			Tala desembocadura Chircal
			Desembocadura Tala
2	Noviembre 2007	Primavera	Nacientes del Tala
			Nacientes del Juncal
			Desembocadura del Juncal
			Nacientes del Sarandí
			Desembocadura del Sarandí
			Nacientes de Laguna Bonita
			Desembocadura de Laguna Bonita
3	Febrero 2008	Verano	Desembocadura del Tala
			Nacientes del Tala
			Nacientes del Juncal
			Desembocadura del Juncal
			Nacientes del Sarandí
			Desembocadura del Sarandí
			Nacientes de Laguna Bonita
4	Julio 2008	Otoño	Desembocadura del Tala
			Nacientes del Tala
			Nacientes del Juncal
			Desembocadura del Juncal
			Nacientes del Sarandí
			Desembocadura del Sarandí
			Nacientes de Laguna Bonita
5	Setiembre 2008	Invierno	Lagunas feed lot (F1 - F4)
			Desembocadura del Tala
			Nacientes del Tala
			Tala nuevo camino
			Desembocadura del Juncal
			Desembocadura del Sarandí
6	Diciembre 2008	Primavera	Tala picada
			Desembocadura del Tala
			Nacientes del Tala
6	Diciembre 2008	Primavera	Tala nuevo camino

				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
7	Marzo 2009	Verano		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
8	Junio 2009	Otoño		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
9	Octubre 2009	Primavera		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
10	Diciembre 2009	Primavera		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
11	Marzo 2010	Verano		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
12	Junio 2010	Otoño		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
13	Diciembre 2010	Primavera		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí
				Tala picada
				Desembocadura del Tala
14	Marzo 2011	Verano		Nacientes del Tala
				Tala nuevo camino
				Desembocadura del Juncal
				Desembocadura del Sarandí

15	Junio 2011	Otoño	Tala picada
			Desembocadura del Tala
			Nacientes del Tala
			Tala nuevo camino
			Desembocadura del Juncal
			Desembocadura del Sarandí
16	Diciembre 2011	Primavera	Tala picada
			Desembocadura del Tala
			Nacientes del Tala
			Tala nuevo camino
			Desembocadura del Juncal
			Desembocadura del Sarandí
			Tala picada
			Desembocadura del Tala

Tabla 25 a. Planificación de los diferentes puntos de muestreo de agua Uruguay.

Nº muestreo	Fecha	Estación	Puntos
1	Agosto 2006	Invierno	Colonia Palma
			Tomás Gomensoro
			Ruta 14 Km 465
			Ruta 15 Km 195
			Rio Cebollatí
2	Setiembre 2006	Invierno	Ruta Laguna Merín Km 9
			Placido Rosas
			INIA Treinta y Tres
			Rio Cebollatí
3	Noviembre 2006	Primavera	Colonia Palma
			Ruta 14 Km 465
			Ruta 15 Km 195
			Rio Cebollatí
			Ruta Laguna Merín Km 9
			INIA Treinta y Tres
4	Diciembre 2006/	Verano	Placido Rosas
			Tomás Gomensoro
			Rio Cebollatí*
5	Febrero 2007	Verano	Colonia Palma

			Ruta 14 Km 465
			Ruta 15 Km 195
			Rio Cebollatí
			Placido Rosas
			Ruta Laguna Merín Km 9
			INIA Treinta y Tres
			Rio Cebollatí, cuenca alta y media
			Rio Olimar, cuenca alta y media
6	Marzo 2007	Verano	Colonia Palma
			Tomás Gomensoro
			Ruta 14 Km 465
			Ruta 15 Km 195
			INIA Treinta y Tres
			Placido Rosas
			Ruta Laguna Merín Km 9

Tabla 25 b. Planificación de los diferentes puntos de muestreo de agua en Uruguay.
*Se muestreó en dos fechas; Diciembre 2006 y Enero 2007.

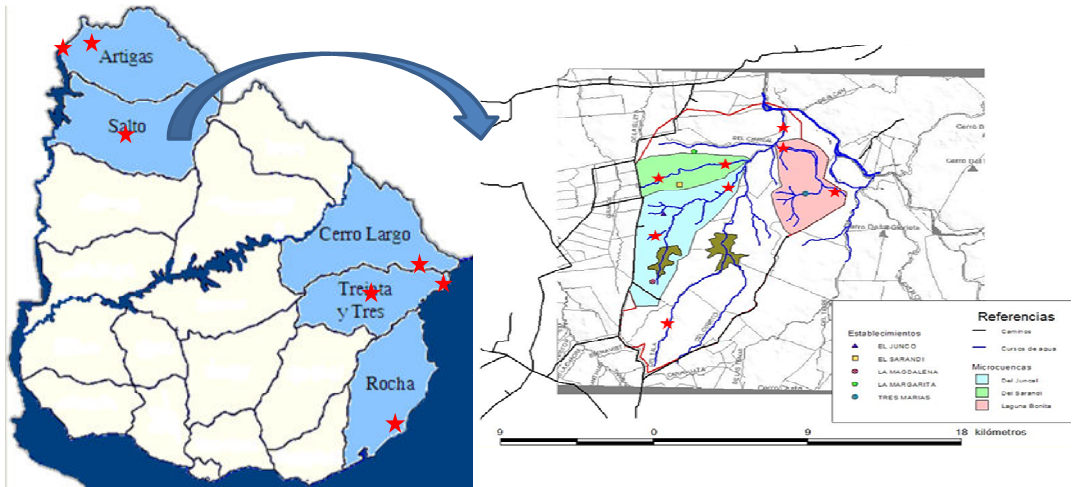


Figura 31. Mapa del Uruguay con los principales puntos de muestreo.

España

El muestreo fue realizado por técnicos que tomaron muestras en diferentes puntos de una zona perteneciente al Parque Natural de la Albufera en Valencia, España. Los puntos seleccionados se encuentran marcados en la **Figura 32**.

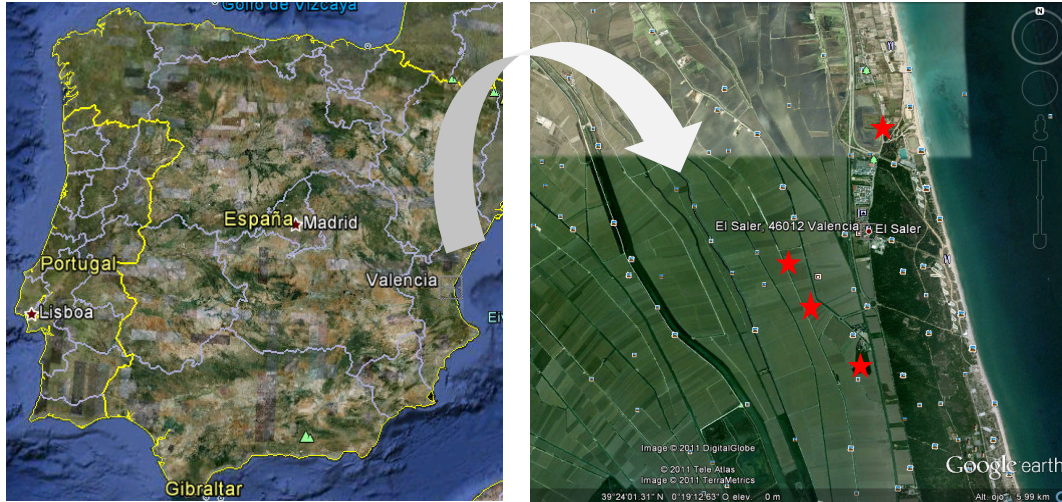


Figura 32. Mapa de España y la región de la Albufera ampliada con los puntos de muestreo.

A continuación se muestran algunas fotografías de diferentes puntos del muestreo en Uruguay (**Figura 33**) y en España (**Figura 34**).

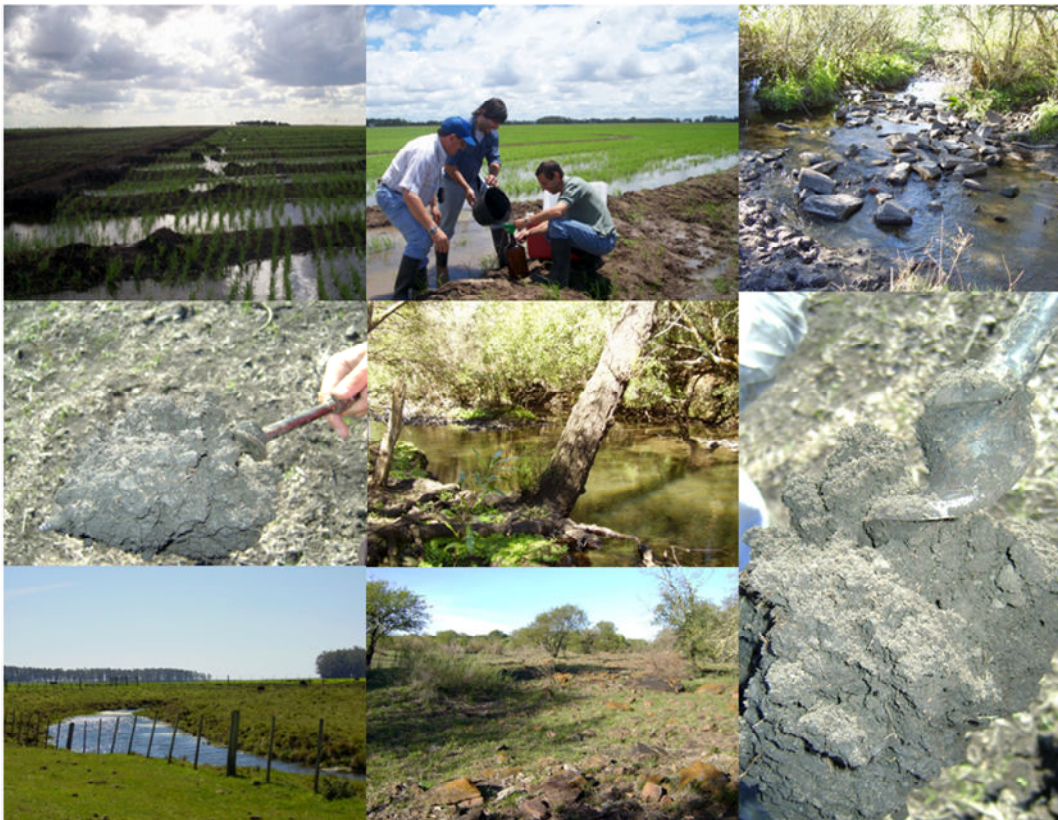


Figura 33. Fotografías de diferentes puntos de muestreo en Uruguay.



Figura 34. Fotografías de diferentes puntos de muestreo en España.

10.7. Validación de Métodos de Análisis de Pesticidas en Suelo, Agua y Grano de Arroz

La validación de las diferentes metodologías para el análisis de pesticidas en suelo, agua y grano de arroz se realizó a partir de la determinación de los siguientes parámetros: veracidad (porcentaje de recuperación), reproducibilidad intra-laboratorio, repetitividad, linealidad, LOD y LOQ según la definición sugerida en las guías de validación de métodos multi-residuos para el análisis de residuos de pesticidas establecida por la DG SANCO que se describen a continuación.⁽²³³⁾

10.7.1. Identificación y confirmación

Según la DG SANCO el criterio de identificación y confirmación de los analitos varía según el sistema de detección utilizado.

Para los análisis realizados mediante LC-DAD, la confirmación de los herbicidas de interés se realizó mediante 2 criterios: el tiempo de retención relativo de cada uno de los analitos y el porcentaje de concordancia con su espectro UV, a partir de la comparación del cromatograma de la muestra con el de una solución de estándares de los herbicidas de concentración conocida.

En algunos casos, la presencia de posibles positivos se testeó variando las condiciones cromatográficas: flujo y fase móvil y empleando métodos de adición de estándares a la solución problema y evaluando cuidadosamente los datos espectrales.

Para los pesticidas analizados mediante LC-MS/MS, el criterio de confirmación utilizado para cada compuesto fue la presencia de 2 iones diagnóstico junto con el ión precursor (2 transiciones), la coincidencia del t_R de estas transiciones con las de un estándar y además la relación (SRM2/SRM1) en la muestra problema debe coincidir con la relación (SRM2/SRM1) obtenida para el estándar.

Para los pesticidas analizados mediante GC-MS, el criterio de confirmación utilizado para cada compuesto fue la presencia de 3 iones diagnóstico, la coincidencia del t_R de estas transiciones con las de un estándar y además la relación (SRM2/SRM1) en la muestra problema debe coincidir con la relación

(SRM2/SRM1) obtenida para el estándar. En GC-MS también se confirmó a partir de biblioteca de espectros de referencia.

10.7.2. Recuperación

Una vez identificados los compuestos de interés la veracidad del método se evaluó a partir de la fortificación de 5 réplicas de una determinada masa de muestra “blanco” en diferentes niveles de concentración conocidos. Posteriormente según la matriz dichas réplicas se analizaron utilizando el método de extracción/clean-up seleccionado y el sistema cromatográfico correspondiente. El valor de recuperación se calculó como la relación entre la concentración experimental y la teórica y expresado en porcentaje.

10.7.2.1. Muestra blanco

La DG SANCO define a un blanco como una muestra o una porción u extracto de muestra que se sabe que no contiene niveles detectables de los analitos de interés.

Las muestras blanco utilizadas en este trabajo fueron:

Suelo: se utilizó suelo franco de bajo contenido en materia orgánica ($L\downarrow OM$) proveniente de cultivos de arroz recolectado previo a la aplicación de herbicidas.

Agua: para el desarrollo del método de análisis de herbicidas mediante LC-DAD se utilizó agua destilada y una vez validada dicha metodología se utilizó agua proveniente de cultivos de arroz. Mientras que para la validación de las metodologías mediante LC-MS/MS se utilizó agua de cultivos de arroz.

Arroz blanco: para el desarrollo de las diferentes metodologías de análisis tanto mediante LC-DAD como LC-MS/MS se utilizó una muestra de arroz orgánico.

Arroz paddy: se utilizó el arroz “testigo” preparado en las condiciones experimentales descritas en la sección 14.1.2. Para lo cual durante el cultivo del arroz testigo se aplicaron dosis mínimas de herbicidas con el fin de no evitar la pérdida del cultivo.

Tanto para aguas como para arroz, dada la dificultad para conseguir una muestra libre de pesticidas, estas muestras fueron analizadas de la misma manera que las muestras reales para demostrar la ausencia de compuestos por encima del nivel de detección del método. En caso de presencia de pesticidas ésta fue considerada a la hora de realizar la evaluación de los resultados.

10.7.2.2. Ensayo de fortificación

El ensayo de fortificación consiste en el agregado de un volumen conocido de una solución de una determinada concentración, conteniendo todos los analitos en estudio, a una masa de muestra (también conocida) de forma que se conoce exactamente la concentración final de los pesticidas en esa muestra.

Los diferentes métodos de fortificación se describieron para cada una de las muestras analizadas.

10.7.3. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

La repetitividad del método se evaluó mediante la fortificación de 5 réplicas para cada uno de los niveles seleccionados. A partir de las áreas obtenidas se calculó el % RSD.

La repetitividad del instrumento se determinó a partir de la inyección por quintuplicado de una solución de la curva de calibración en matriz de 0,1 mg/L para los análisis realizados mediante LC-DAD y de una solución de 10 µg/L para los análisis realizados en LC-MS/MS. A partir de las áreas obtenidas se calculó la RSD del instrumento. La reproducibilidad intra-laboratorio del método, también expresada como % RSD, se evaluó a partir del análisis con diferentes operarios en el caso del suelo y en diferentes días para agua y arroz.

10.7.4. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de la preparación de curvas de calibración en solvente y en matriz (en diferentes

rangos de concentración según la matriz en estudio) a partir de soluciones de estándares de los pesticidas de interés.

La preparación de la curva en matriz (matrix matched) consiste en la extracción de la muestra blanco utilizando el mismo método de análisis que las muestras reales. El extracto obtenido es luego retomado en una solución de los pesticidas de interés a una concentración conocida. Se realiza este procedimiento para cada uno de los puntos de la curva de calibración.

A partir de los datos de áreas obtenidos y con la ayuda del programa Microsoft® Excel se graficó el área vs concentración, para cada uno de los analitos obteniéndose comportamientos lineales, del tipo ($y = ax + b$) y se calculó el coeficiente de correlación (r^2).

10.7.5. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de la curva de calibración en matriz a diferentes concentraciones según el tipo de muestra. Calculándose mediante regresión, la mínima concentración para la cual se observa una S/N mayor o igual que 3. Este valor fue luego verificado experimentalmente.

En el caso de LC-MS/MS y GC-MS se tomó la mínima concentración para la cual la transición de confirmación presenta una S/N mayor o igual que 3.

El LOQs se determinó a partir de la inyección de una solución de la curva de calibración en matriz a diferentes concentraciones según el tipo de muestra. Calculándose mediante regresión, la mínima concentración para la cual se observa una S/N mayor o igual que 10. Este valor fue luego verificado experimentalmente. En el caso de LC-MS/MS y GC-MS se tomó la mínima concentración para la cual la transición de cuantificación presenta una S/N mayor o igual que 10.

10.7.6. Efecto matriz

Comparación cuantitativa: Para los métodos desarrollados mediante LC-MS/MS se evaluó la supresión u aumento de la señal a partir de la

comparación de la pendiente de la curva de calibración de cada estándar en solvente y en matriz según se definió en la sección 7.1 de la Introducción.⁽²⁴⁰⁾

En algún caso se consideró interesante estudiar el EM de manera *cualitativa*, a partir de la evaluación de los perfiles del cromatograma de iones totales obtenidos mediante el análisis en full scan con un LC-TOF/MS, cuando se varían diferentes parámetros tales como la cantidad de muestra y diferentes métodos de extracción y clean-up.

Suelo

11. Suelo

11.1. Tratamiento de Muestra

Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas plásticas y mantenidas a 0 °C, posteriormente se congelaron y luego se liofilizaron y tamizaron para su posterior utilización.

11.2. Validación de Métodos de Análisis de Herbicidas en Suelo Mediante LC-DAD

11.2.1. Determinación del % de recuperación

11.2.1.1. Ensayo de fortificación

En un Erlenmeyer se colocó una muestra de suelo blanco de forma de que cubriera toda la superficie del recipiente. Se adicionó a la muestra y gota a gota 1 mL de una solución de los pesticidas de interés, incluidos en la **Tabla 20**, en acetona/MeOH (1:1, v/v) de concentración apropiada de forma de alcanzar una concentración de pesticidas en la muestra de 0,5 mg/kg. A continuación se dejó 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz de forma de eliminar el resto de solvente. El estudio del % Rec. se realizó por quintuplicado para cada uno de los niveles de concentración ensayados.⁽¹²⁵⁾

11.2.2. Repetitividad y Reproducibilidad

Como se definió en la sección **10.7.3**.

11.2.3. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de curvas de calibración preparadas a partir de las soluciones de estándares en solvente y en matriz en el rango de 0,1 a 10,0 mg/L y de 0,25 a 10,0 mg/L.

11.2.4. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de 100 µg/L de la curva de calibración en matriz. El LOQ tal como se definió en la sección **10.7.5**.

11.2.5. Métodos de extracción y clean-up

Método 1: Diez gramos de suelo previamente liofilizados y tamizados se colocaron en un Erlenmeyer de 250 mL. A continuación se adicionaron 20 mL de una mezcla de MeOH:AcOEt (70:30) y se agitó por acción magnética. Luego de 4 horas, se filtró el extracto obtenido y se lavó 2 veces con 10 mL de la misma mezcla de solventes. La mezcla de lavado se juntó con el extracto previamente obtenido y se transfirió todo el volumen a un balón para proceder a la eliminación del solvente hasta sequedad. Este procedimiento se realizó a 40 °C en un evaporador a vacío. El extracto obtenido se re-disolvió en 1 mL de ACN, se filtró con un filtro de teflón de 0,45 µm, transfiriéndose la muestra a un vial para su análisis como se describe en la sección 10.5.1.⁽¹²⁵⁾

Método 2: Este método se basó en una adaptación del procedimiento descrito en el manual de métodos analíticos para el análisis de residuos de agroquímicos, para el análisis de los herbicidas del tipo sulfonilureas en suelos.⁽¹⁵⁹⁾

Se extrajeron 15 g de suelo dos veces con 60 mL de una mezcla de MeOH y $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 0,1 M (1:9, v/v) usando agitación con pastilla magnética. Luego de cada extracción los extractos obtenidos se centrifugaron a 3500 r.p.m durante 10 min, de forma de separar el sobrenadante del sólido. A continuación los dos sobrenadantes juntos se pasaron a través de un cartucho de extracción en fase sólida del tipo: Oasis[®] HLB, previamente acondicionados con 6 mL de MeOH pH 3, seguido de 6 mL de MeOH-0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (2:1, v/v). El recipiente conteniendo la fracción de sobrenadantes se lavó con 6 mL de agua que también se pasaron por el cartucho. Posteriormente el cartucho fue secado y se eluyeron los analitos de interés con 2 x 1 mL de MeOH pH 3 y luego con 2 x 1 mL ACN. Los 4 mL de extracto obtenidos se evaporaron a sequedad bajo corriente de N_2 y posteriormente se re-disolvió en 1 mL de ACN. Las muestras se filtraron con un filtro de 0,45 µm directamente a un vial para su análisis como se describe en la sección 10.5.1.

Método 3: 10 g de suelo fueron transferidos a un tubo de tapa rosca de 100 mL y se adicionaron 20 mL de una mezcla de solvente MeOH: AcOEt (70:30). A continuación los tubos se colocaron en un baño de ultrasonido por 15 minutos.

El extracto obtenido se filtró a vacío y los sólidos se lavaron con 5 mL de la mezcla de solventes. La solución obtenida se transfirió a un balón de 25 mL y se eliminó el solvente en un evaporador a presión reducida hasta sequedad a una temperatura de 40 °C. Por último se re-disolvió en 1 mL ACN, se filtró con un filtro de 0,45 µm directamente a un vial para su análisis como se describe en la sección **10.5.1.**⁽¹²⁵⁾

Método 4: 10 g de suelo fueron extraídos con 50 mL de MeOH mediante agitación con un shaker orbital a una velocidad de 135 r.p.m. por 24 horas. El extracto fue filtrado y el sólido se lavó con 5 mL de solvente. El extracto fue transferido a un balón de 100 mL y evaporado a sequedad a 40 °C y presión reducida en un evaporador a vacío. Finalmente el residuo obtenido se re-disolvió en 1 mL de ACN y se filtró con un filtro 0,45 µm directamente a un vial para su análisis como se describe en la sección **10.5.1.**⁽¹²⁵⁾

11.2.6. *Análisis cromatográfico*

El análisis cromatográfico de las muestras de agua, tanto del ensayo de recuperación como el de las muestras reales se realizó mediante LC-DAD como se describe en la sección **10.5.1.**

11.2.7. *Análisis de muestras reales*

Se analizaron más de 80 muestras de suelo provenientes de los diferentes puntos de muestreo y de diferentes momentos a lo largo de los diferentes ciclos de cultivo de arroz.

Agua de cultivos de arroz

12. Agua

12.1. Tratamiento de la Muestra

Una vez transportadas al laboratorio, las muestras de agua fueron filtradas a vacío mediante filtros de membrana de vidrio de 0,7 μm (Teknokroma, España) para su posterior utilización.

12.2. Validación de Métodos de Análisis de Herbicidas en Agua de Cultivos de Arroz Mediante LC-DAD

12.2.1. Determinación del % de recuperación

12.2.1.1. Ensayo de fortificación

Para la validación del método de análisis de herbicidas en agua proveniente de cultivos de arroz se decidió primero evaluar la performance de los métodos que se describen a continuación en agua potable. Para esto se seleccionaron 3 niveles de concentración (0,1; 0,3 y 0,5 $\mu\text{g/L}$) y se adicionó una cantidad apropiada de una solución estándar de los herbicidas de interés, incluidos en la **Tabla 20**, a 250 mL de agua destilada, de forma de lograr los niveles deseados; 0,1; 0,3 y 0,5 $\mu\text{g/L}$. A continuación se desarrollaron los métodos 1 y 2.

Los niveles de concentración evaluados agua de cultivos de arroz fueron 1 y 5 $\mu\text{g/L}$ obtenidos como se describió para agua potable.

12.2.2. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

La repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio se evaluaron como se describe en la sección **10.7.3**.

12.2.3. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de curvas de calibración preparadas a partir de las soluciones de estándares en solvente y en matriz en el rango de 25 $\mu\text{g/L}$ a 1,25 mg/L.

12.2.4. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de 10 µg/L de la curva de calibración en matriz. El LOQ tal como se describe en la sección como **10.7.5**.

12.2.5. Métodos de extracción y clean-up

Método 1: 250 mL de agua ajustada a pH 3 con H₃PO₄ al 50%. La muestra se pre-concentró en cartuchos Oasis[®] HLB previamente acondicionados con 3 mL de MeOH pH 3 y 3 mL de agua pH 3 por medio de un manifold operando a vacío. El cartucho se secó y los analitos de interés se eluyeron con 2x1 mL de MeOH pH 3 y con 2x1 mL de ACN. El eluido obtenido (4 mL) se secó bajo atmósfera de N₂ a sequedad y posteriormente se re-disolvió en 0,2 mL de ACN, consiguiendo una concentración de la muestra en un factor de 1250. El extracto se filtró con un filtro de 0,45 µm directamente a un inserto que se colocó en un vial para su análisis como se describe en la sección **10.5.1**.

Método 2: Se siguió exactamente el mismo procedimiento del método 1, pero esta vez utilizando los cartuchos de C-18.^(174,175,176,184,259)

12.2.6. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de las muestras de agua, tanto del ensayo de recuperación como el análisis de las muestras reales se realizó mediante LC-DAD como se describe en la sección **10.5.1**.

12.2.7. Análisis de muestras reales

Se analizaron más de 100 muestras de aguas provenientes de los diferentes puntos de muestreo y de diferentes momentos a lo largo de los diferentes ciclos de cultivo de arroz.

12.3. Validación de Métodos de Análisis de Pesticidas en Agua de Cultivos de Arroz Mediante LC-QqQ/MS

12.3.1. Determinación del % de recuperación

12.3.1.1. Ensayo de fortificación

En un matraz aforado de 1000 mL se colocó un volumen de agua de cultivos de arroz y se fortificó con 200 µL de una solución estándar en MeOH, conteniendo los pesticidas de interés, incluidos en la **Tabla 21**, para lograr una concentración de 0,1, 0,3 y 0,5 µg/L, luego se procedió a la preparación de la solución de agua fortificada, mediante el agregado del resto del agua hasta el aforo del matraz. A partir del agua fortificada se realizó el procedimiento de pre-concentración en cartuchos OASIS® HLB por quintuplicado.

Los % Rec se calcularon como se describe en la sección **10.7.2**.

12.3.2. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

La repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio se evaluaron como se describe en la sección **10.7.3**.

12.3.3. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de curvas de calibración preparadas a partir de las soluciones de estándares en solvente y en matriz en el rango de 5 a 750 µg/L excepto para el bispiribac sodio, fluroxipir, y triadimenol que el rango fue de 10 a 750 µg/L y para el kresoxim metil la linealidad se evaluó entre 50 - 750 µg/L.

12.3.4. Efecto matriz

La evaluación cuantitativa se realizó según lo especificado en la sección **10.7.6**.

12.3.5. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de 5 µg/L de la curva de calibración en matriz. El LOQ tal como se describe en la sección **10.7.5**.

12.3.6. Método de extracción y clean-up

Se filtraron 100 mL de agua ajustada a pH 3 con H₃PO₄ al 50%, a vacío con filtros de 0,7 µm y luego mediante filtros de 0,45 µm. A continuación se añadió TPP (surrogate estándar). El surrogate es un analito no contenido en una muestra que se agrega en una concentración determinada a cada una de las porciones de muestra previo a la extracción (ya sea en estudio de recuperación o en muestras reales) y también a la curva de calibración con el fin de chequear la performance del método.

La muestra filtrada se pre-concentró en un cartucho OASIS[®] HLB previamente acondicionado con 3 mL de MeOH pH 3 y 3 mL de agua pH 3 por medio de un manifold operando a vacío. El cartucho se secó y los analitos de interés se eluyeron con 2x1 mL de MeOH pH 3 y con 2x1 mL de ACN. El eluido obtenido (4 mL) se secó bajo atmósfera de N₂ a sequedad y posteriormente se re-disolvió en 1 mL de ACN: agua (20:80 v/v), consiguiendo una concentración de la muestra en un factor de 100. El extracto se filtró con un filtro de 0,45 µm directamente a un inserto que se colocó en un vial para su análisis según las condiciones descriptas en la sección **10.5.2**.⁽²⁵⁹⁾

12.3.7. Análisis cromatográfico.

Los ensayos de recuperación y el análisis de las muestras reales se realizaron como se describió en la sección **10.5.2**.

12.4. Validación de Método de Análisis de Pesticidas en Agua de Cultivos de Arroz Mediante LC-QLIT/MS

12.4.1. Determinación del % de recuperación

12.4.1.1. Ensayo de fortificación

Durante el desarrollo de esta metodología, no se realizó ninguna etapa de extracción y clean-up, sino que la muestra fue diluida y posteriormente inyectada directamente en la columna cromatográfica. Por este motivo no fue necesario realizar fortificaciones con el fin de chequear la performance del método relativo al % Rec. La fortificación de las muestras se realizó con el fin de estudiar el resto de los parámetros de la validación del método en cada uno de los pesticidas incluidos en la **Tabla 23**: linealidad, LOQ, LOD, reproducibilidad, repetitividad y efecto matriz.

12.4.2. Repetitividad y Reproducibilidad

La repetitividad y reproducibilidad se evaluaron como se describe en la sección **10.7.3**.

12.4.3. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de curvas de calibración preparadas a partir de las soluciones de estándares en solvente y en matriz en el rango de 0,5 a 50,0 µg/L.

12.4.4. Efecto matriz

Se estudió el efecto matriz de forma cuantitativa como se definió en la sección **10.7.6**.⁽²⁴⁰⁾

12.4.5. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de 5 µg/L de la curva de calibración en matriz. El LOQ tal como se describe en la sección **10.7.5**.

12.4.6. Método de análisis

Luego de la recolección de las muestras se ajustó el pH con H_3PO_4 al 50% y como se comentó en la sección **5.1.2** se filtraron con un filtro de $0,7\ \mu\text{m}$ y se mantuvieron a $-20\ ^\circ\text{C}$ hasta el momento de su análisis para evitar la degradación de los compuestos de interés. En el momento del análisis se tomaron $900\ \mu\text{L}$ de agua y se adicionaron $100\ \mu\text{L}$ de una solución conteniendo el surrogate estándar (nicotina d_3) y el mix de los pesticidas a estudiar ambos en ACN. Para el análisis de las muestras reales se tomaron $900\ \mu\text{L}$ de muestra que fueron adicionados con una solución conteniendo únicamente $100\ \mu\text{L}$ de nicotina d_3 . La solución resultante se filtró mediante filtros de PTFE de $0,45\ \mu\text{m}$ y se inyectó directamente en la columna sin realizar clean-up ni pre-concentración.

12.4.7. Análisis cromatográfico

Los ensayos de recuperación y el análisis de las muestras reales se realizaron en las condiciones descriptas en la sección **10.5.4**.

12.4.8. Análisis de muestras reales

Para la evaluación de la performance del método se analizaron 59 muestras de diferente procedencia; 33 de España y 26 de Uruguay.

Arroz

13. Arroz

13.1. Tratamiento de la muestra

Las muestras de arroz fueron transportadas al laboratorio en bolsas plásticas y previo a su análisis fueron mantenidas en desecador durante 24 horas y posteriormente fueron molidas en un molino para cereales para obtener harina de arroz.

13.2. Validación de Métodos de Análisis de Herbicidas en Arroz Blanco Mediante LC-DAD

13.2.1. Determinación del % de recuperación

13.2.1.1. Ensayo de fortificación

Para los estudios de recuperación se tomó una muestra representativa de arroz molido, la cual fue pesada y transferida a un mortero en donde fue fortificada con un volumen apropiado de una solución estándar en acetona de los analitos incluidos en la **Tabla 20**, de forma de alcanzar un nivel de 100, 250 y 500 µg/kg. La muestra fue mezclada durante 30 min de forma de asegurar una completa homogeneización y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente para eliminar los restos del solvente.

13.2.2. Repetitividad y Reproducibilidad

La reproducibilidad intra-laboratorio se evaluó para los tres niveles de fortificación estudiados, con 3 operarios como se indica en la sección **10.7.3**.

13.2.3. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de curvas de calibración preparadas a partir de las soluciones de estándares en solvente y en matriz en el rango de 0,1 a 10,0 mg/L.

13.2.4. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de 0,1 mg/L de la curva de calibración en matriz. El LOQ tal como se describe en la sección 10.7.5.

13.2.5. Métodos de extracción y clean-up

Para el análisis de herbicidas en arroz blanco se compararon diferentes métodos, de forma de evaluar la performance de cada uno de ellos. Las metodologías evaluadas se describen a continuación y se esquematizan en la **Figura 35**.

Método 1: 5 g de arroz previamente molido y homogeneizado se agitan con 20 mL de MeOH durante unos segundos. Posteriormente se realiza una extracción por medio de ultrasonido, durante 15 min. El extracto obtenido es centrifugado durante 10 min a 3700 r.p.m. Una alícuota del sobrenadante (15 mL) es evaporada a sequedad en un evaporador a vacío a 40 °C. Finalmente el extracto obtenido es redissuelto en 1 mL de ACN y filtrado mediante jeringa a la cual se le colocó un filtro de 0,45 µm para su posterior análisis.

Método 2: 10 g de arroz previamente molido y homogeneizado se agitan con 20 mL de MeOH durante unos segundos. Posteriormente se realiza una extracción por medio de ultrasonido, durante 15 min. Al extracto obtenido se le adicionan 1,9 g de MgSO₄ y 100 mg de carbón activado, se agita manualmente y se centrifuga durante 10 min a 3700 r.p.m., una alícuota del sobrenadante (10 mL) es evaporada a sequedad en un evaporador a vacío a 40 °C. Finalmente el extracto obtenido es redissuelto en 1 mL de ACN y filtrado mediante jeringa a la cual se le colocó un filtro de 0,45 µm para su posterior análisis.

Método 3: 5 g de arroz previamente molido y homogeneizado se agitan con 5 mL de agua ultra pura. A continuación se adicionan 20 mL de MeOH con 1% de HAc y se agita vigorosamente durante unos minutos. Al extracto obtenido se le adicionan 5 g de MgSO₄, se agita manualmente durante 4 minutos y se centrifuga durante 10 min a 3700 r.p.m. Una alícuota del sobrenadante (15 mL) es filtrada a través de una columna previamente empacada con Na₂SO₄ y

evaporada a sequedad en un evaporador a vacío a 40 °C. Finalmente el extracto obtenido es redissuelto en 1 mL de ACN y filtrado mediante jeringa a la cual previamente se le colocó un filtro de 0,45 µm para su posterior análisis.

Método 4: 5 g de arroz previamente molido y homogeneizado se agitan con 5 mL de agua ultra pura. A continuación se adicionan 20 mL de ACN con 1% de HAc y se agita vigorosamente durante 4 minutos. Al extracto obtenido se le adicionan 5 g de MgSO_4 , se agita manualmente y se centrifuga durante 10 min a 3700 r.p.m. Una alícuota del sobrenadante (15 mL) es filtrada a través de una columna previamente empacada con Na_2SO_4 y evaporada a sequedad en un evaporador a vacío a 40 °C. Finalmente el extracto obtenido es redissuelto en 1 mL de ACN y filtrado mediante jeringa a la cual previamente se le colocó un filtro de 0,45 µm para su posterior análisis.

Método 5: 10 g de arroz previamente molido y homogeneizado se agitan con 10 mL de agua ultra pura. A continuación se adicionan 20 mL de ACN con 1% de HAc y se agita vigorosamente durante 1 minuto. Al extracto obtenido se le adicionan 7 g de MgSO_4 , y 1,8 g de $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, se agita manualmente durante 4 min y se centrifuga durante 10 min a 3700 r.p.m. Una alícuota del sobrenadante (19 mL) es filtrada a través de una columna previamente empacada con Na_2SO_4 y evaporada a sequedad en un evaporador a vacío a 40 °C. Finalmente el extracto obtenido es redissuelto en 1 mL de ACN y filtrado mediante jeringa a la cual previamente se le colocó un filtro de 0,45 µm para su posterior análisis. ^(134,148,150,154,159,260,261)

Experimental

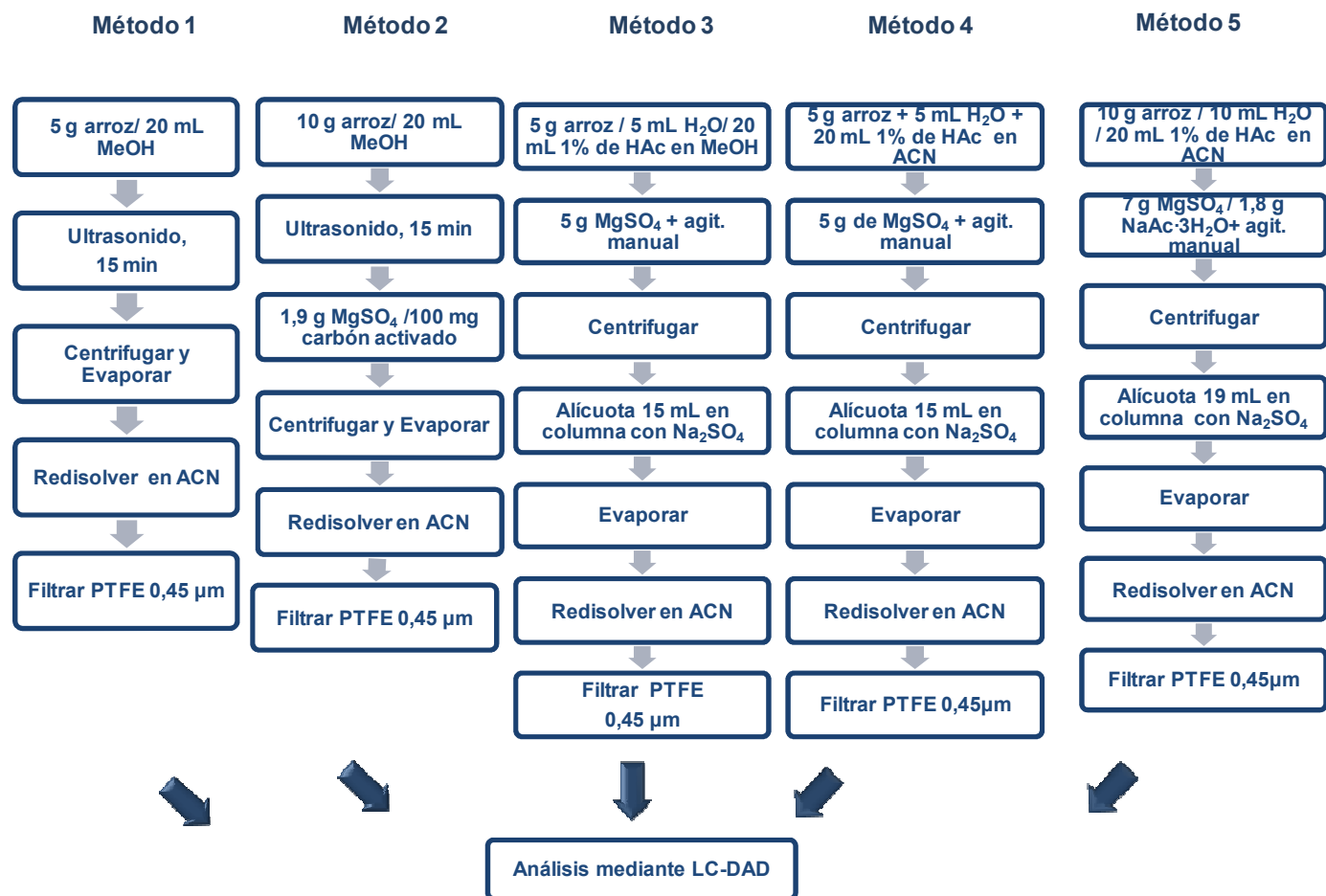


Figura 35. Diagrama de flujo de los diferentes métodos testeados para el análisis de herbicidas en arroz mediante LC-UV/DAD.

13.2.6. Análisis cromatográfico

Los ensayos de recuperación y el análisis de las muestras reales se realizaron mediante el método descrito en **10.5.1**.

13.2.7. Análisis de muestras reales

Para la evaluación de la performance del método se analizaron 21 muestras de grano de arroz.

13.3. Validación de Métodos de Análisis de Residuos de Pesticidas en Arroz Blanco Mediante LC-QqQ/MS

13.3.1. Determinación del % de recuperación

13.3.1.1. Ensayo de fortificación

Para los estudios de recuperación se tomó una muestra representativa de arroz molido, la cual fue pesada y transferida a un mortero en donde fue fortificada con un volumen apropiado de una solución estándar en acetona de los analitos de interés, incluidos en la **Tabla 21**, de forma de alcanzar un nivel de 10 y 300 µg/kg. La muestra fue mezclada durante 30 min de forma de asegurar una completa homogeneización y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente para eliminar los restos del solvente.

13.3.2. Repetitividad y Reproducibilidad

La repetitividad se evaluó como se también se indica en la sección **10.7.3** a partir de una muestra de concentración 10 µg/kg en matriz. El estudio de la reproducibilidad se realizó como se describe en la sección **10.7.3**, en 3 días consecutivos.

13.3.3. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de curvas de calibración preparadas a partir de las soluciones de estándares en solvente y en matriz en el rango de 5,0-500 µg/L.

13.3.4. Efecto matriz

Se realizó la comparación cualitativa de los perfiles obtenidos al variar la cantidad de muestra y con diferentes métodos de extracción y clean-up, en las condiciones descritas en la sección **10.5.3**.

El estudio cuantitativo del efecto matriz se realizó según lo especificado en la sección **10.7.6**.

13.3.5. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de 10 µg/L de la curva de calibración en matriz. El LOQ tal como se describe en la sección **10.7.5**.

13.3.6. Métodos de extracción y clean-up

Se compararon diferentes variaciones del método de QuEChERS y paralelamente se evaluaron diferentes masas de muestra de arroz; 5; 7,5 y 10 g. Debido a que el contenido de agua en arroz es bajo, previo al análisis se adicionó agua, en una relación 1:1 (agua: solvente de extracción), de forma de favorecer el contacto con el solvente de extracción en los pasos sucesivos. ^(117,141,157,175,188,192,193,229 262,263)

Las variaciones evaluadas se describen a continuación y se esquematizan en la **Figura 36**.

Método A1: QuEChERS original.

X mL de agua ultra pura fueron adicionados a X g de arroz molido en un tubo falcon de 50 mL. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora y posteriormente se adicionaron 15 mL ACN y 200 µl de una solución de TPP estándar en MeOH de concentración 25 µg/mL, se agitó unos segundos y a continuación se agregaron 4 g de MgSO₄ anhidro y 1 g de NaCl. La mezcla se agitó manualmente durante 4 minutos y se centrifugó durante 5 min a 3700 r.p.m. 5 mL del sobrenadante fueron trasferidos a un tubo falcon de 15 mL conteniendo 300 mg de MgSO₄ y 100 mg de PSA. El extracto fue agitado en vortex por 20 s y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente 1 mL del extracto fue secado bajo atmósfera de N₂, redissuelto en 1mL de ACN y filtrado usando filtros de teflón de 0,45 µm.^(134,149,153)

Método A2: QuEChERS citrato.

X mL de agua ultra pura fueron adicionados a X g de arroz molido en un tubo falcon de 50 mL. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora y posteriormente se adicionaron 15 mL ACN y 200 µl de una solución de TPP estándar en MeOH de concentración 25 µg/mL, se agitó unos segundos y a continuación se agregaron 4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de NaCl, 1 g citrato de sodio di-hidratado y 0,5 g de citrato de sodio sesquihidratado. La mezcla se agitó manualmente durante 4 minutos y se centrifugó durante 5 min a 3700 r.p.m. 5 mL del sobrenadante fueron trasferidos a un tubo falcon de 15 mL conteniendo 750 mg de MgSO₄, 150 mg de C-18 y 150 mg de PSA. El extracto fue agitado en vortex por 20 s y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente 1 mL del extracto fue secado bajo atmósfera de N₂, redissuelto en 1mL de ACN y filtrado con filtros de 0,45 µm.^(146,153)

Método A3: QuEChERS citrato sin clean-up.

X mL de agua ultra pura fueron adicionados a X g de arroz molido en un tubo falcon de 50 mL. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora y posteriormente se adicionaron 15 mL ACN y 200 µl de una solución de TPP estándar en MeOH de concentración 25 µg/mL, se agitó unos segundos y a continuación se agregaron 4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de NaCl, 1 g citrato de sodio di-hidratado

y 0,5 g de citrato de sodio sesquihidratado. La mezcla se agitó manualmente durante 4 minutos y se centrifugó durante 5 min a 3700 r.p.m. 5 mL del sobrenadante fueron trasferidos a un tubo falcon de 15 mL conteniendo 1 g de MgSO_4 . El extracto fue agitado en vortex por 20 s y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente 1 mL del extracto fue secado bajo atmósfera de N_2 , redissuelto en 1mL de ACN y filtrado usando filtros de 0,45 μm .⁽¹⁹⁴⁾

Método A4: QuEChERS acetato sin clean-up.

X mL de agua ultra pura fueron adicionados a X g de arroz molido en un tubo falcon de 50 mL. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora y posteriormente se adicionaron 15 mL ACN conteniendo 1% de HAc y 200 μL de una solución de TPP estándar en MeOH de concentración 25 $\mu\text{g/mL}$, se agitó unos segundos y a continuación se agregaron 7 g de MgSO_4 anhidro, 1,8 g de $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. La mezcla se agitó manualmente durante 4 minutos y se centrifugó durante 5 min a 3700 r.p.m. 5 mL del sobrenadante fueron trasferidos a un tubo falcon de 15 mL conteniendo 1 g de MgSO_4 . El extracto fue agitado en vortex por 20 s y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente 1 mL del extracto fue secado bajo atmósfera de N_2 , redissuelto en 1mL de ACN y filtrado con filtros de 0,45 μm .^(148,150,151,155,151,194,264)

Experimental

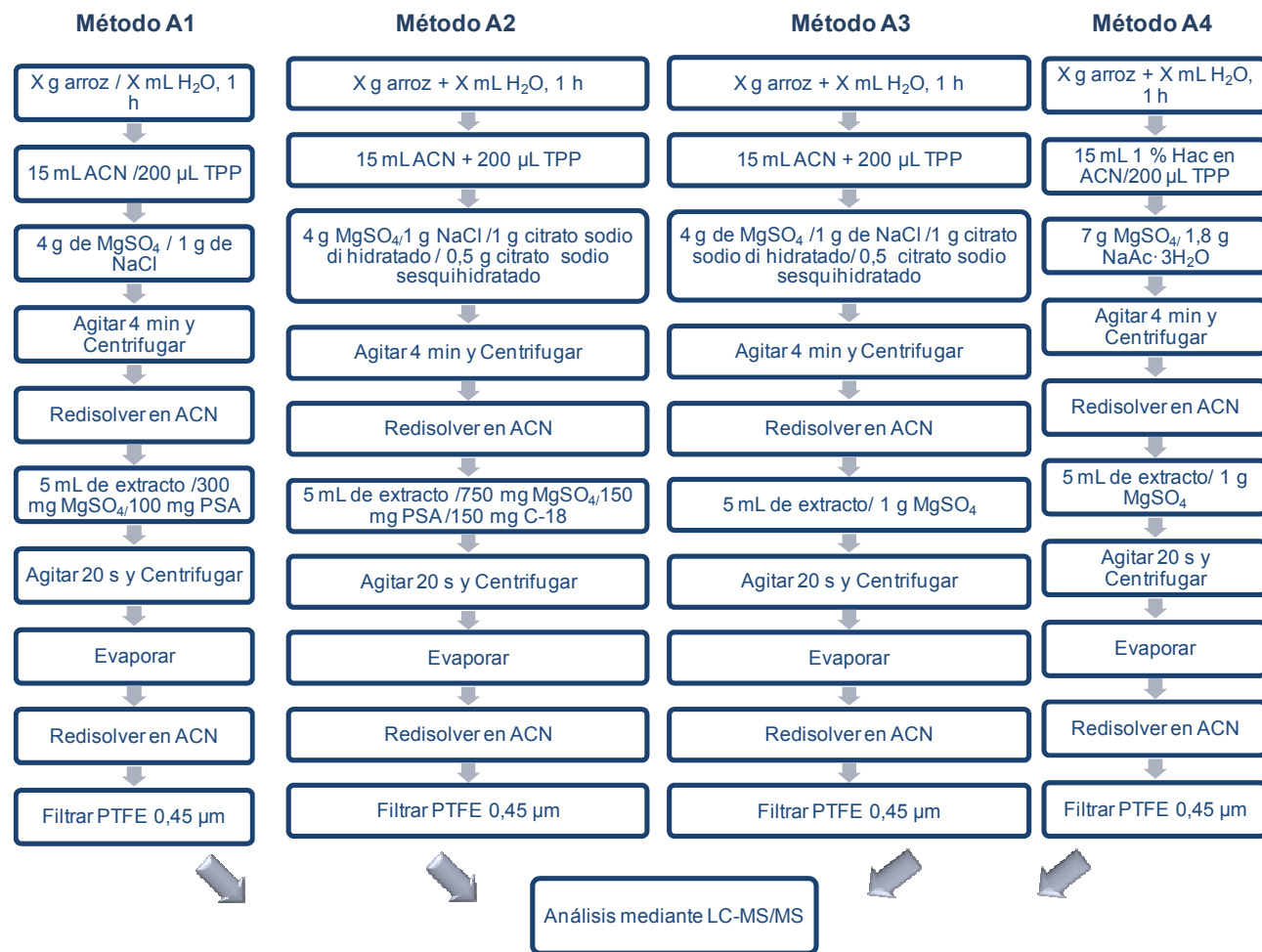


Figura 36. Diagrama de flujo de los diferentes métodos testeados para el análisis de pesticidas en arroz blanco mediante LC-QqQ/MS. X=5, 7,5 y 10 g de agua y arroz.

13.3.7. Análisis cromatográfico

Los ensayos de recuperación y el análisis de las muestras reales se realizaron como se describe en la sección **10.5.2**.

13.3.8. Análisis de muestras reales

Se analizaron 18 muestras de arroz comercial de diferentes procedencias, España, China, India, Pakistán, Vietnam, entre otros.

13.4. Validación de Métodos de Análisis de Residuos de Pesticidas en Arroz Paddy Mediante LC-QqQ/MS

13.4.1. Determinación del % de recuperación

13.4.1.1. Ensayo de fortificación

Para los estudios de recuperación se pesó una muestra representativa de arroz paddy molido que fue posteriormente transferida a un mortero. 5 réplicas fueron fortificadas homogéneamente con una solución estándar en acetona de los pesticidas incluidos en la **Tabla 21 y 22**, de forma de alcanzar una concentración de 20 y 200 µg/kg. Se mezcló durante 30 minutos, de forma de asegurar la homogeneización y se dejó en reposo a temperatura ambiente, durante toda la noche, para lograr la completa evaporación del solvente.

13.4.2. Repetitividad y Reproducibilidad

La repetitividad se evaluó como se indica en la sección **10.7.3**, a partir de una muestra de concentración 20 µg/kg en matriz. La reproducibilidad intra-laboratorio se realizó en 3 días consecutivos como se describe en la sección **10.7.3** para los dos niveles de fortificación estudiados, 20 y 200 µg/kg.

13.4.3. Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de curvas de calibración preparadas a partir de las soluciones de estándares en solvente y en matriz en el rango de 10,0-500 µg/L.

13.4.4. Efecto matriz

Se realizó la comparación cualitativa, de los perfiles obtenidos con 2 métodos de extracción y clean-up utilizados.

El estudio cuantitativo del efecto matriz se realizó según lo especificado en la sección 10.7.6.

13.4.5. LOD & LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de una solución de 10 µg/L de la curva de calibración en matriz. El LOQ tal como se describe en la sección 10.7.5.

13.4.6. Métodos de extracción y clean-up

Los métodos de extracción y clean-up ensayados para arroz paddy se basaron en 3 de los métodos previamente evaluados en arroz blanco (método A1, A2 y A5 (194), con modificaciones en cuanto a la proporción de muestra, solvente y agua utilizadas.^(187,225,227,263) (**Figura 37**)

En este caso se usaron 5 g de muestra, que fueron extraídos con 10 mL de agua y 15 mL de ACN. La agitación se realizó con un extractor axial automático. El programa de extracción se consistió en una amplitud de 90 mm, velocidad: 2 m/s, aceleración: 99 m/s², brusquedad: Nivel 5, sin delay y un tiempo total 16 min.⁽²⁶⁵⁾

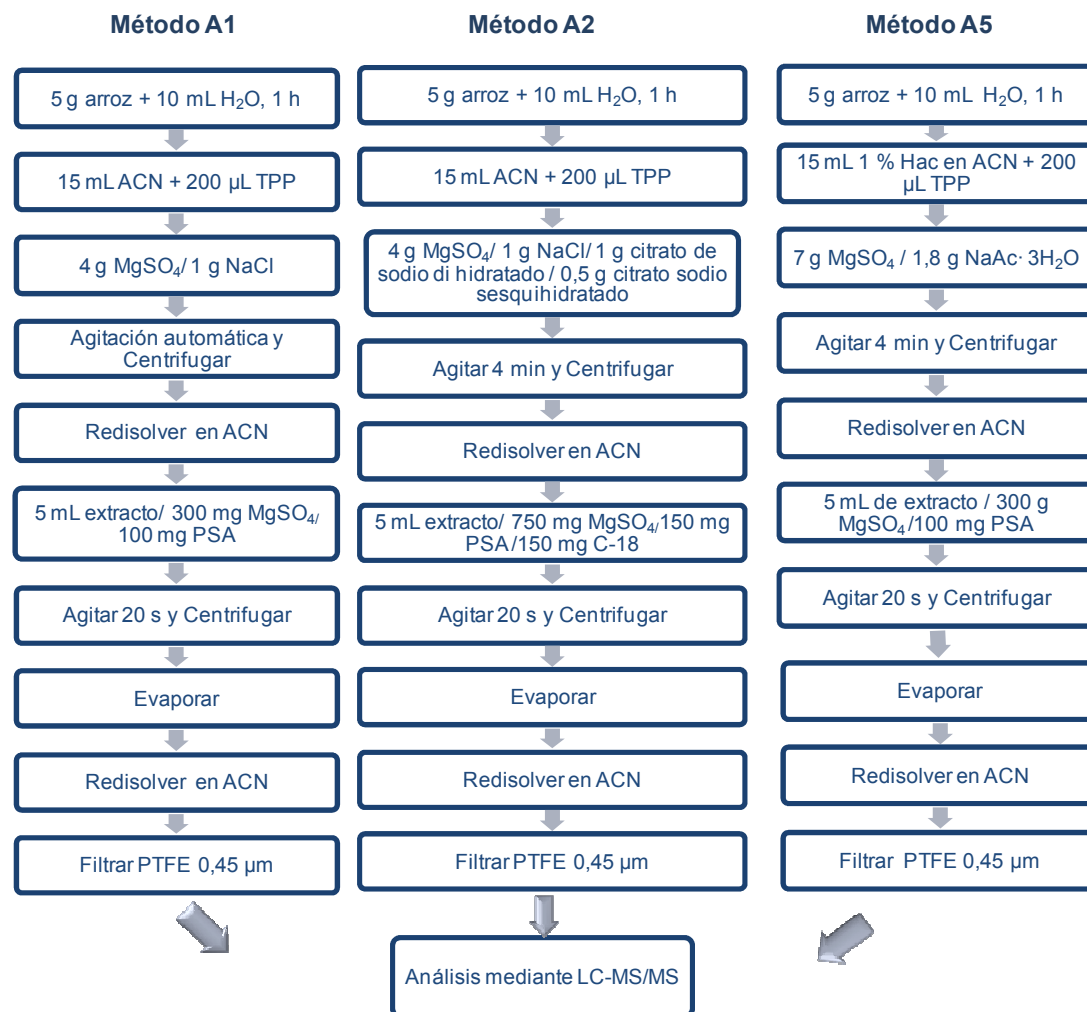


Figura 37. Diagrama de flujo de los diferentes métodos testeados para el análisis de pesticidas en arroz paddy mediante LC-QqQ/MS.

13.4.7. Análisis cromatográfico

Los ensayos de recuperación y el análisis de las muestras reales se realizaron con el método descrito en la sección **10.5.2**.

13.4.8. Análisis de muestras reales

Se analizaron 3 muestras reales de arroz paddy.

Residualidad de pesticidas en el procesamiento del arroz

14. Estudio de la Distribución de Residuos de Pesticidas Aplicados en Condiciones Controladas en Campo, en Diferentes Productos Obtenidos Durante el Procesamiento de Arroz

14.1. Experimento en campo

14.1.1. Preparación del arroz tratado

El arroz utilizado en este experimento fue cultivado en el Departamento de Salto, Uruguay (31°38'S 57°96'O) en una parcela de 10 x 25 m (250 m²) de extensión.

El cultivo de arroz se realizó bajo el mismo sistema en el que se cultiva normalmente el arroz en nuestro país. El laboreo y la preparación del suelo se realizaron en el período de octubre-noviembre. Previo a la siembra se aplicó clomazone y glifosato y un fertilizante a una dosis de 100 kg/ha. A finales de octubre y noviembre se registraron fuertes lluvias (619 mm), lo que retrasó la siembra hasta mediados de diciembre. En este momento se sembraron 161 kg de semilla/ha, de variedad El Paso L144.

La emergencia de la planta de arroz comenzó el 22 de diciembre, y una semana después se aplicó quinclorac y por último, el 17 de enero se aplicaron los siguientes herbicidas bispiribac sodio, clomazone y una segunda dosis de quinclorac. A su vez, en el mes de marzo, se realizaron dos aplicaciones de fungicidas al cultivo y una de insecticidas. En la **Tabla 26** se encuentran resumidas las dosis, número de aplicaciones y pesticidas utilizados en este estudio y en la **Figura 38** se presenta un registro de las precipitaciones en el periodo desde la siembra hasta la cosecha del arroz.

Todas las aplicaciones de pesticidas se realizaron mediante una mochila aspersora de 10 L de forma de evitar la contaminación generada por la deriva de los pesticidas, al resto del cultivo. Cabe aclarar que las dosis aplicadas de estos pesticidas fueron el doble a la dosis recomendada para cultivos de arroz. En condiciones normales se utilizan solo 2 herbicidas de pre-emergencia (glifosato y clomazone), uno de post-emergencia y uno o dos fungicidas. Sólo en caso de ser necesario se aplica algún insecticida.

Debido a la alteración en el calendario ocasionada por las fuertes lluvias registradas, el arroz fue finalmente cosechado en el mes de mayo. Una vez

cosechado el suelo fue removido, aireado y cubierto con paja de arroz, para preparar la parcela para próximos cultivos.

Luego de cosechado, el arroz fue limpiado y secado hasta un 13% de humedad, se homogeneizó y finalmente se obtuvieron 100 kg de arroz cáscara (paddy). Este fue procesado para obtener las diferentes commodities; arroz cargo (integral), arroz blanco (pulido) y como subproductos arroz quebrado (medio grano) y afrechillo. A continuación las diferentes matrices fueron homogeneizadas para asegurar un correcto muestreo y transportadas hasta el laboratorio.

Categoría	Principio activo	Nº aplicaciones; mes	Dosis (L/ha)
Herbicidas	Bispiribac sodio	1; Enero	0,5
	Clomazone	1; Enero	4,0
	Propanil	1; Enero	15
	Quinclorac	1; Enero	6,0
Fungicidas	Azoxistrobín	2; Marzo	0,5
	Carbendazím	2; Marzo	2,0
	Epoxiconazol	2; Marzo	2,4
	Difenocolazol	2; Marzo	0,5
	Isoprotiolane	2; Marzo	2,5
	Kresoxim-metil	2; Marzo	2,4
	Tebuconazol	2; Marzo	1,2
	Triciclazol	2; Marzo	0,36
	Trifloxistrobín	1; Marzo	1,6
Insecticidas	λ -cihalotrina	1; Marzo	0,36
	Tiametoxam	1; Marzo	0,36

Tabla 26. Esquema de tratamiento del cultivo de arroz en campo.

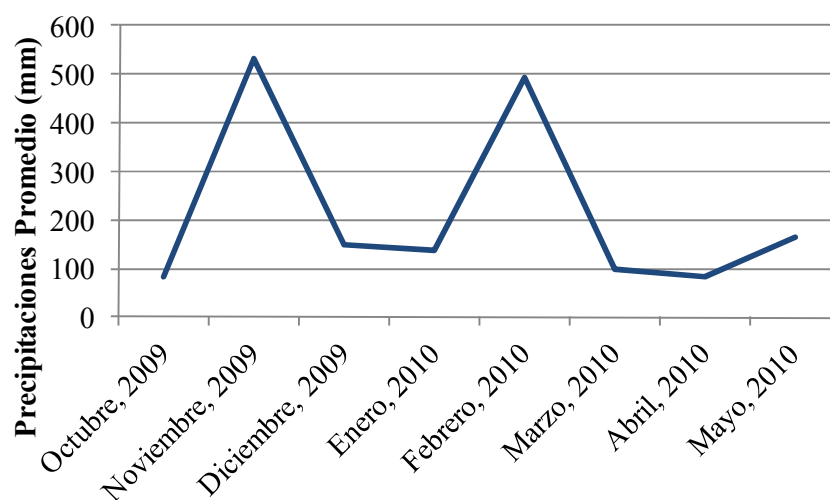


Figura 38. Precipitaciones promedio (mm) ocurridas durante el cultivo del arroz.

14.1.2. Preparación de la matriz “blanco”

El arroz utilizado como matriz blanco para los estudios de validación fue cultivado y cosechado en las mismas condiciones detalladas anteriormente pero en una parcela aislada del material tratado. Luego de cosechado el arroz fue procesado en las mismas condiciones descriptas para la preparación del material tratado.

14.2. Experimentos de laboratorio

14.2.1. Preparación de la muestra

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio se realizó un sub-muestreo de forma representativa. Todas las sub-muestras (500 g) fueron mantenidas en desecador durante 24 hs. Posteriormente cada una de las muestras fue molida en un molino para cereales, obteniendo una harina para cada una de las diferentes fracciones.

Las muestras fueron extraídas utilizando los métodos QuEChERS original y citrato descriptos para arroz paddy y analizadas según se describe en las secciones **10.5.2** y **10.5.6**. Es necesario aclarar que de acuerdo a las recomendaciones de la DG SANCO se seleccionaron el arroz blanco y el arroz

paddy como matrices representativas para la validación de dichas metodologías.⁽²³³⁾

14.3. Validación de las metodologías de análisis

Las diferentes matrices obtenidas fueron analizadas con los procedimientos validados y descritos en las secciones **13.3 y 13.4**. Las cifras de mérito estudiadas se describen en la sección **10.7**.

Procesos de oxidación avanzada

15. Degradación del Quinclorac Mediante Fotólisis Directa y Fotocatálisis en Diferentes Sistemas Acuáticos

15.1. Agua utilizada

El agua utilizada para este experimento provino de campos de cultivos de arroz de la zona de Valencia, España. Una vez transportada al laboratorio se filtró mediante filtros de 0,7 µm para eliminar sólidos en suspensión. Posteriormente fue analizada con la metodología descrita en la sección **12.4** para asegurar la ausencia de residuos de quinclorac.

15.2. Soluciones stock

Se prepararon soluciones madre de QNC y ^{13}C -cafeína a una concentración de 2 mg/mL en acetona y MeOH, respectivamente. A partir de estas soluciones se prepararon las diluciones de trabajo.

15.3. Determinación del Carbono Orgánico Disuelto (COD)

Para la medida del COD se filtraron 12-15 mL de la muestra a través de un filtro de 0,22 µm antes de introducirla en el muestreador del equipo. A continuación se produce la inyección automática de la muestra y se realiza la medida de COD por diferencia entre el Carbono Total (CT) y el Carbono Inorgánico Total (CIT).⁽²⁶⁶⁾

15.4. Experimentos de hidrólisis

La hidrólisis de quinclorac se desarrolló en matraces de 50 mL a pH 4 y 8 en agua ultra pura a una concentración inicial de 5 mg/L. Los matraces fueron mantenidos a temperatura ambiente, al abrigo de la luz, por dos meses. Durante este tiempo se tomaron 5 alícuotas, se realizó una dilución para lograr una concentración aproximada de 1 mg/L que fueron analizadas mediante LC-QTOF/MS/MS y cuantificadas por comparación con un estándar de concentración 1 mg/L, preparado al momento de cada análisis.

15.5. Experimentos de fotólisis directa

Se evaluó la degradación fotoquímica del quinclorac en distintas matrices de agua; agua ultra pura y agua proveniente de cultivos de arroz). Posteriormente se intentó identificar los distintos productos de transformación (PTs) generados. Los experimentos de foto degradación se realizaron utilizando un simulador solar, equipado con una lámpara de arco de Xenón de 1,1 kW y filtros especiales que restringen la transmisión de la luz por debajo de 290 nm. El sistema de filtros mencionado corresponde a un rango de aproximadamente 22 W/m² en el espectro ultravioleta (300-400 nm). La intensidad de la radiación fue constante y se mantuvo, durante todos los experimentos, en 250 W/m² (intensidad mínima) y 700 W/m². Este valor corresponde a dosis de intensidad de irradiación equivalentes a un día soleado en primavera u otoño, alrededor de las 10 de la mañana en España. Para los estudios se utilizaron recipientes de vidrio de 1000 mL con camisa refrigerante, conteniendo 300 mL de una solución de quinclorac de 5 mg/L, agitados mediante agitadores magnéticos (**Figura 39**). La temperatura durante todos los experimentos, varió entre 22-35°C. Se trabajó a dos pH: 4 y 8 ya que diferencias en la composición del suelo pueden generar distinto pH en agua.

Se irradió durante 10 horas, tomándose alícuotas cada 1 hora que fueron analizadas mediante el método que se describe en la sección **10.5.5**.

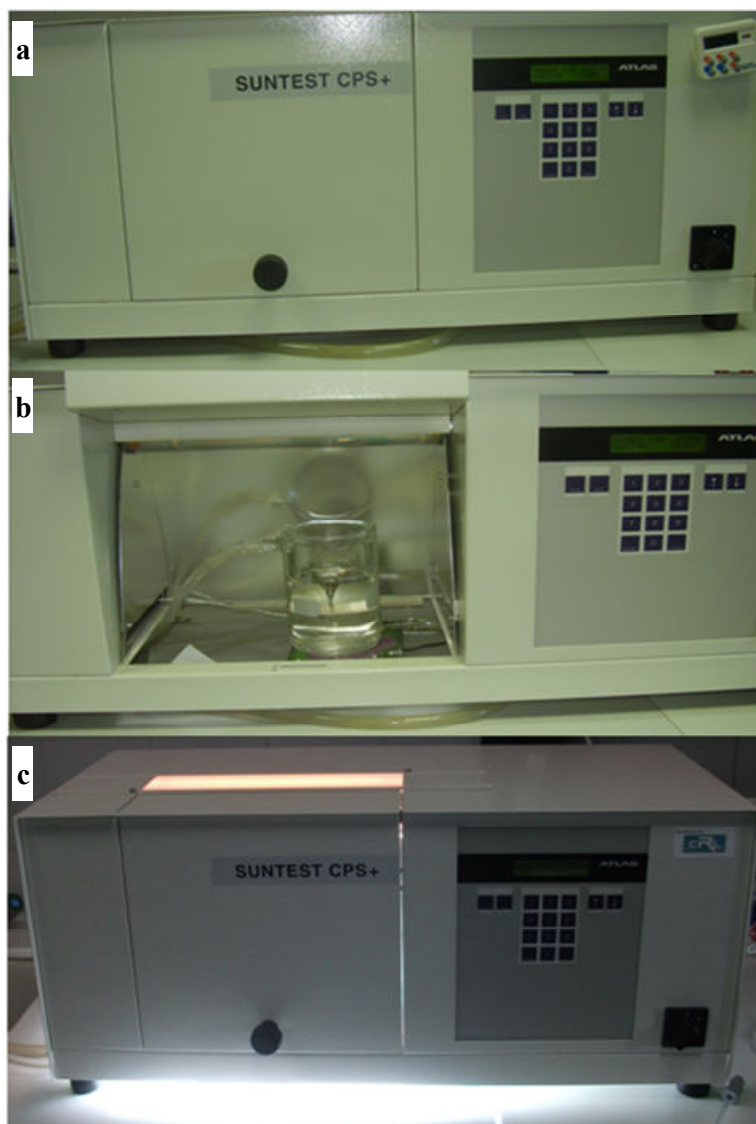


Figura 39. Suntest para el tratamiento de quinclorac, **a**-equipo, **b**-solución de QNC en agua, en agitación, **c**-comienzo del ciclo de irradiación.

15.6. Experimentos de fotocatalisis solar

Los experimentos de fotocatalisis se llevaron a cabo en las mismas condiciones que los de fotólisis directa pero usando TiO_2 como catalizador a una concentración de 200 mg/L. El período de irradiación fue de 40 min para agua ultra pura y de 135 min para agua de cultivos de arroz, durante este período se extrajeron alícuotas cada 3 min que fueron centrifugadas a 3700 r.p.m durante

5 min y filtradas mediante filtros de 0,45 μm para su posterior análisis en las condiciones que se describen en la sección **10.5.5**.

15.7. Tratamiento de las muestras mediante SPE

Luego del periodo de irradiación a cada una de las muestras se le adicionó ^{13}C -Cafeína como surrogated estándar para chequear la eficiencia de extracción de la técnica de SPE, según Martínez-Bueno et al., 2011.⁽²⁶⁷⁾

Cada una de las alícuotas (20 mL) tomadas fueron pre-concentradas mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos OASIS[®] HLB. La pre-concentración se realizó mediante un manifold operando a vacío. Los cartuchos fueron pre-acondicionados con 6 mL de MeOH y 6 mL de agua ultra pura con un flujo de 1 mL/min y posteriormente se pasaron 20 mL de la muestra. Seguidamente los cartuchos se secaron con una corriente de N_2 y se procedió a la elución de los analitos de interés con 2x3 mL de MeOH con un flujo de 1 mL/min. El extracto obtenido se concentró en atmósfera de N_2 a 30 °C por medio de un Turbo-Vap. Previo al análisis las muestras fueron reconstituidas con 1 mL de ACN: agua, 1:9 (v/v) y filtradas con filtros de 0,45 μm directamente al vial para su análisis mediante el método que se describe en la sección **10.5.5**.

Resultados y Discusión

Suelo

16. Análisis de Herbicidas en Suelo

16.1. Justificación y objetivos

Los residuos de pesticidas en suelo pueden provocar problemas ambientales importantes. Los herbicidas en particular, presentan diferentes mecanismos de interacción con el suelo; por un lado se unen a las partículas de suelo mediante procesos de absorción o adsorción por interacciones iónicas pero también pueden escurrir o lixiviar, contaminando otros recursos naturales.^(268,269) Esto es particularmente importante en el caso del sistema de cultivo de arroz donde, en general, el sistema de irrigación favorece la movilización de los pesticidas en grandes extensiones. Por otro lado, la textura y composición del suelo y las propiedades físico-químicas de los compuestos, tales como la constante de Henry, K_{ow} , y el K_{oc} juegan un rol fundamental en el destino ambiental y en la persistencia de dichos pesticidas en el ecosistema.

Desde el punto de vista analítico, el suelo es una matriz compleja y variable por lo que para la determinación de residuos de pesticidas es crucial considerar su composición química para lograr buenos resultados.⁽²⁷⁰⁾

Las técnicas utilizadas para el análisis de dichos contaminantes en suelos hasta hace algunos años, se basaron en métodos de extracción exhaustivos, principalmente para el análisis de compuestos de baja polaridad; piretroides, organoclorados y organofosforados.⁽²⁷¹⁾ En la actualidad se han desarrollado metodologías para el análisis de compuestos de polaridad media a alta como por ejemplo para las sulfonilureas, pero en general dichos métodos no incluyen otras familias de compuestos⁽¹⁷⁷⁾; por lo que el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una metodología adecuada para el análisis simultáneo de diferentes herbicidas de post-emergencia comúnmente aplicados en el cultivo de arroz en Uruguay con el fin de evaluar la presencia de dichos contaminantes en suelos de diferente composición y textura provenientes de las principales zonas de cultivo de nuestro país.

16.2. Desarrollo de metodología para análisis de herbicidas en suelo mediante LC-DAD

16.2.1. Selección de los herbicidas

Los analitos incluidos en este ensayo fueron 6 herbicidas de post-emergencia; bispiribac sodio, bensulfurón-metil, bentazone, cihalofop-butil, pirazosulfurón-metil y metsulfurón-metil, posteriormente se adicionaron otros 3 herbicidas: clomazone, propanil y quinclorac ampliamente usados en cultivos de arroz en Uruguay.

16.2.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

Una de las primeras etapas para el desarrollo del método cromatográfico es la selección de las condiciones de trabajo del HPLC; tipo de fase móvil (FM), flujo de fase móvil y volumen de inyección. La optimización de estos parámetros es crucial a la hora del diseño de un método multi-residuo mediante cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (LC-DAD), ya que es necesario eliminar la mayor cantidad posible de interferencias de la matriz y asegurar la máxima resolución de los picos de los analitos, para así poder identificarlos correctamente a partir de su espectro UV.

Estos herbicidas pertenecen a diferentes familias químicas y algunas de sus propiedades fisicoquímicas son muy distintas, entre ellas la hidrofobicidad que va desde compuestos polares como el metsulfurón-metil y el bentazone a otros relativamente no polares como el cihalofop-butil, por lo que desarrollar un método cromatográfico multi-residuo que permita el análisis simultáneo de estos herbicidas constituye un importante desafío.

Para la optimización de la fase móvil se testearon diferentes flujos (0,8; 1 y 1,2 mL/min) con un volumen de inyección de 20 µL. Se observó una mejor sensibilidad trabajando a 1,2 mL/min comparado con los otros dos flujos testeados, por lo que se continuó trabajando en estas condiciones.

La selección de la fase móvil se realizó a partir de mezclas de ACN y agua en diferentes proporciones y gradientes. La FM óptima para la separación de los 6 herbicidas consistió en un programa isocrático durante 12 min, seguido de un gradiente lineal, de forma de aumentar la composición de fase orgánica (ACN)

de la fase de corrida y finalmente una nueva etapa isocrática de 20 min de duración. Con el fin de mejorar la elución de bispiribac sodio fue necesario ajustar el pH de la fase acuosa en la FM y el de las muestras de agua a pH 3, de esta forma el grupo ácido de dichas moléculas se mantiene en su forma protonada.

En la **Figura 40** se observa un cromatograma para los 6 herbicidas del estudio en suelo fortificado a un nivel de 0,5 mg/kg.

Durante la primera elución isocrática se puede observar una línea de base limpia, sin ruido que luego cambia cuando aumenta la proporción de solvente orgánico desde (48:52 a 80:20). En los últimos minutos se re-establece la línea de base. En estas condiciones de análisis se comprobó la ausencia de interferencias a los diferentes tiempos de retención de los 6 analitos en diferentes muestras problema. Los tiempos de retención y sus espectros de absorción se presentan en la **Tabla 20**.

Las condiciones óptimas desarrolladas para la separación cromatográfica de los herbicidas en estudio en suelo se aplicaron para otros tres herbicidas, quinclorac, propanil y clomazone muy usados también en cultivos de arroz en nuestro país.⁽¹²⁵⁾ Bajo las condiciones cromatográficas optimizadas, se observó la co-elución de bensulfurón-metil con clomazone y el bispiribac sodio con propanil. Por este motivo fue necesario realizar 2 determinaciones por separado utilizando las condiciones descriptas en la sección **10.5.1**.

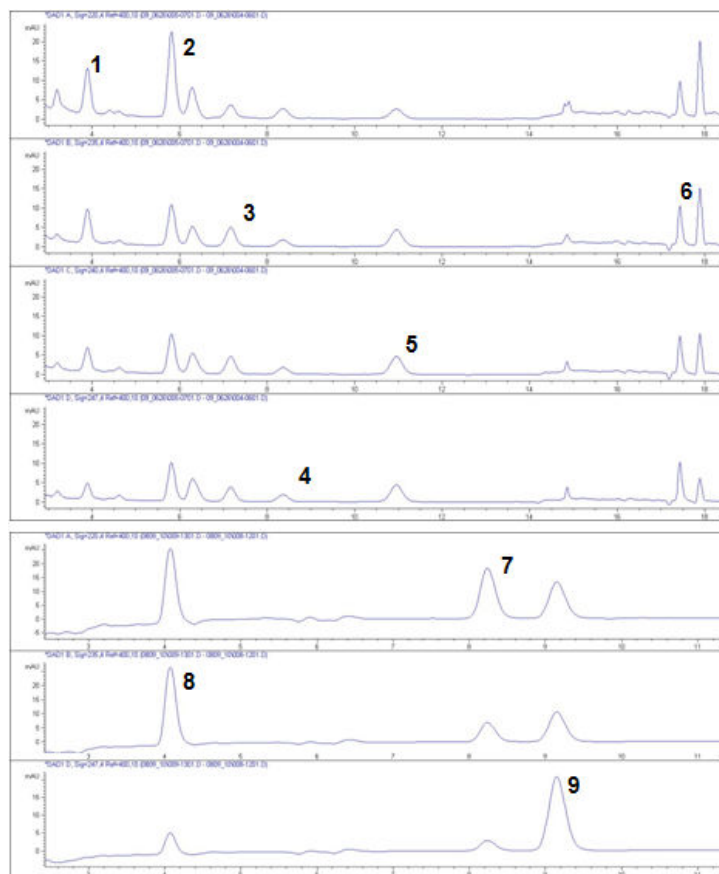


Figura 40. Cromatograma de un extracto de suelo franco a 0,5 mg/kg obtenido con el método 4; (1) metsulfurón-metil; (2) bentazone; (3) bensulfurón-metil; (4) bispiribac sodio; (5) pirazosulfurón-etil; y (6) cihalofop-butyl, (7) clomazone, (8) quinclorac, (9) propanil. Cada herbicida está señalado a su respectiva longitud de onda como se presenta en la **Tabla 19**.

16.2.3. Tipos de suelo seleccionados

En nuestro país existen suelos de diferente composición según las distintas zonas de cultivo de arroz. Previo al desarrollo de las metodologías de análisis de herbicidas estos suelos fueron caracterizados por la Facultad de Agronomía, en donde se determinó el porcentaje de arena, limo y arcilla, el contenido de materia orgánica (MO) y su pH. La composición de dichos suelos se presenta en la **Tabla 27**.

Para el desarrollo de la metodología de extracción y clean-up se seleccionó un suelo franco de bajo contenido en materia orgánica (L↓OM), uno de los más frecuentemente encontrados en las zonas en donde se cultiva arroz en

Uruguay.⁽¹²⁵⁾ Se evaluaron 4 metodologías de extracción y clean-up y posteriormente se compararon dichas metodologías para otros tipos de suelo; suelo franco arcilloso con diferente porcentaje en MO (CL↓OM y CL↑OM) y un suelo arcilloso con alto contenido en MO (C↑OM).

Tipo de suelo	pH en agua	% MO	% Arena	% Limo	% Arcilla
CL↓OM	5,7	2,4	34	27	39
C↑OM	5,4	7,1	23	26	51
L↓OM	5,1	2,9	50	28	22
CL↑OM	5,4	5,8	33	37	30

Tabla 27. Características de los diferentes tipos de suelos evaluados.

16.2.4. Validación de la metodología

16.2.4.1. Estudio de recuperación

Comparación de métodos de extracción y clean-up

La comparación del porcentaje de recuperación (% Rec.) obtenidos para cada uno de los 9 analitos en estudio con los diferentes métodos desarrollados se realizó a partir de una muestra de suelo blanco fortificado a 0,5 mg/kg.

Debido a la diferencia en polaridad de estos compuestos fueron evaluados distintos solventes para su extracción; ACN, acetona, MeOH, AcOEt:MeOH y una solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en MeOH. Además se testearon diferentes condiciones de extracción y clean-up de los extractos basados en diferentes metodologías reportadas para análisis de pesticidas en suelo.^(159,167,171)

A partir de estos estudios preliminares y en base a los % Rec. obtenidos y la presencia de interferencias durante el análisis en LC-DAD se seleccionaron cuatro combinaciones de solvente/método de agitación buscando las condiciones de análisis óptimas.

Las 4 metodologías seleccionadas fueron:

- **Método 1:** Agitación magnética con una mezcla AcOEt:MeOH.
- **Método 2:** Agitación magnética con una solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en MeOH.⁽¹⁵⁹⁾

- **Método 3:** Ultrasonido con una mezcla AcOEt:MeOH.
- **Método 4:** Extracción en shaker orbital con MeOH.

El método 2 corresponde a una modificación a la metodología descrita en la literatura para el análisis de sulfonilureas en suelo.⁽¹⁵⁹⁾ Para este caso, los mejores resultados se obtuvieron cuando la solución obtenida luego de la extracción con la solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en MeOH se pre-concentró a través de un cartucho tipo OASIS® HLB.

En las 3 metodologías restantes el extracto obtenido se concentró y se inyectó directamente sin una etapa previa de clean-up. Las recuperaciones obtenidas para cada uno de los analitos en estudio se encuentran resumidas en la **Tabla 28**.

Herbicidas	Método 1 % Rec. (% RSD)	Método 2 % Rec. (% RSD)	Método 3 % Rec. (% RSD)	Método 4 % Rec. (% RSD)
Bensulfurón-metil	92 (15)	89 (5)	76 (13)	76 (5)
Bentazone	92 (1)	63 (20)	87 (0,1)	81 (2)
Bispiribac sodio	23 (23)	37 (1)	24 (2)	51 (9)
Cihalofof-butil	86 (0,2)	73 (3)	82 (15)	84 (3)
Metsulfurón-metil	75 (9)	73 (4)	69 (13)	78 (1)
Pirazosulfurón-etil	74 (4)	99 (6)	98 (7)	79 (3)
Clomazone	84 (9)	22 (24)	-	87 (6)
Propanil	89 (2)	43 (3)	-	81 (3)
Quinclorac	38 (5)	17 (7)	-	28 (6)

Tabla 28. % Rec. y % RSD de los diferentes métodos estudiados a 0,5 mg/kg, (n=5).

La DG SANCO establece como criterio para la validación de un método que el % Rec. para cada uno de los pesticidas debe encontrarse en el rango 70-120% con una RSD menor a 20%.⁽²³³⁾ Siguiendo este criterio, como se puede observar en la **Tabla 28**, los métodos 1 y 4 presentan los mejores resultados, con % Rec. mayores a 70% excepto para bispiribac sodio y quinclorac.

De los cuatro métodos seleccionados, el único que permite obtener buenas recuperaciones para el bispiribac sodio en suelo franco es el método 4. El método 2 presentó resultados aceptables para las sulfonilureas, de acuerdo a lo reportado, pero los otros herbicidas, bentazone, bispiribac sodio, propanil y quinclorac presentaron % Rec. bajos.

Por otro lado, se comprobó que el uso de un solvente orgánico para la extracción, es más eficiente que el uso de soluciones acuosas para la recuperación de los herbicidas menos polares como el cihalofop-butil, clomazone y propanil.

16.2.4.2. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

En el nivel de fortificación de 0,5 mg/kg todos los herbicidas presentaron RSD menores a 20%.

La reproducibilidad intra-laboratorio evaluada a partir del análisis con 3 operarios diferentes, demostró que no existen diferencias significativas en los resultados.

16.2.4.3. Linealidad

La linealidad de los herbicidas se evaluó tal como se describe en la sección **10.7.4**.

Todos los herbicidas mostraron comportamiento lineal, en el rango de 0,1-10 mg/kg, excepto para bispiribac sodio y cihalofop butil cuya linealidad fue en el rango 0,25-10 mg/kg. Todos los herbicidas presentaron coeficientes de correlación (r^2) mayores a 0,99 como se muestra en la **Tabla 29**.

16.2.4.4. LOD y LOQ

Los límites de detección y cuantificación se calcularon para cada uno de los 4 métodos estudiados como se define en la sección **7** del Experimental.

Para los diferentes métodos los valores de LOD de los herbicidas fueron del mismo orden de magnitud. En la **Tabla 29** se presentan los LOD y LOQ para el método 4 que fue el seleccionado para realizar la validación, por presentar la mejor performance para el análisis de bispiribac sodio.

Herbicida	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Ecuación de calibración	r ²
Bensulfurón-metil	3,5	10	y = 53,388x - 2,6649	0,9973
Bentazone	3,5	10	y = 101,4x - 3,1521	0,9985
Bispiribac sodio	8,0	25	y = 30,368x - 1,3704	0,9924
Cihalofof-butil	8,0	25	y = 43,646x - 4,5396	0,9991
Metsulfurón-metil	3,5	10	y = 81,128x + 3,4755	0,9994
Pirazosulfurón-etil	3,5	10	y = 65,457x + 2,8877	0,9987
Clomazone	3,5	10	y = 81,822x - 2,714	0,9978
Propanil	3,5	10	y = 110,5x - 7,7573	0,9978
Quinclorac	3,5	10	y = 222,82x - 7,5064	0,9982

Tabla 29. Límites de detección, cuantificación y linealidad de los diferentes herbicidas obtenidos con el método 4.

16.3. Aplicación de las metodologías desarrolladas en otros tipos de suelo.

Se observó que los % Rec. obtenidos para los diferentes métodos presentaban variaciones según el tipo de suelo utilizado. En la **Figura 41** se muestran los resultados obtenidos para algunos ejemplos de los herbicidas estudiados para los 4 métodos en diferentes tipos de suelo.

Como se observa en la **Figura 41** no es posible seleccionar una metodología única para el análisis de rutina, ya que algunos de estos métodos presentan % Rec. menores a 70% según el tipo de suelo. En el caso de esta matriz tan compleja, la recuperación de los herbicidas de interés está muy influenciada por su composición y textura. Estos resultados concuerdan con información obtenida de bibliografía, de que por ejemplo, las sustancias húmicas se unen fuertemente a moléculas orgánicas, por medio de interacciones iónicas o hidrofóbicas, cambiando el comportamiento de alguno de los compuestos en estudio.^(159,259)

A partir de estos resultados se desprende que la selección del método de análisis va a depender de los herbicidas que se deseen analizar. En suelo franco, excepto el bispiribac sodio todos los herbicidas presentan buenas recuperaciones. El bentazone, una de las sustancias prioritarias en agua y prohibido en muchos países, se recuperó eficientemente en la mayoría de los tipos de suelos evaluados. El cihalofof-butil presentó buenos resultados,

excepto con el método 4 en suelos arcillosos que presentó problemas en su recuperación.

Como se puede observar en la **Figura 41**, en este tipo de suelo las sulfonilureas presentaron muy buenos % Rec. en los 4 métodos evaluados.

El método 4, para suelos franco arcillosos con alto contenido de materia orgánica, presentó recuperaciones bajas para todos los analitos estudiados.

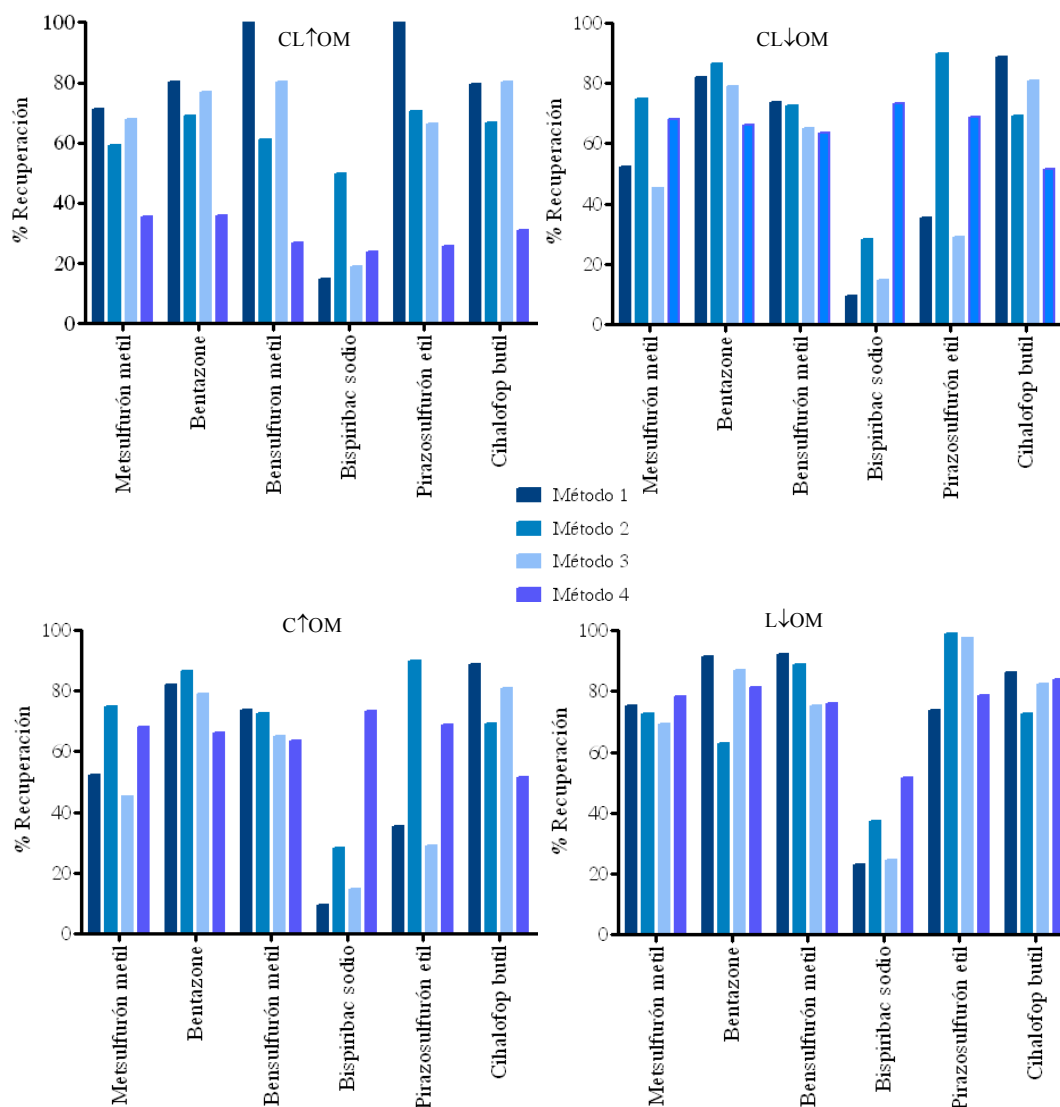


Figura 41. Comparación de los % de Rec. obtenidos con los diferentes métodos de extracción para alguno de los herbicidas en estudio, en suelos de diferente textura.

16.4. Análisis de muestras reales

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas y optimizado el método de extracción y clean-up, se analizaron más de 80 muestras de suelo que fueron recolectadas durante el período 2006-2011. Del total de las muestras analizadas, clomazone fue el herbicida más frecuentemente encontrado, con una concentración promedio de 113,9 $\mu\text{g/kg}$ siendo las concentraciones máximas y mínimas encontradas 225 ± 14 y 56 ± 4 $\mu\text{g/kg}$. Propanil y metsulfurón-metil fueron detectados a niveles inferiores a su LOQ.

La confirmación de la presencia de los herbicidas de interés se realizó siguiendo los 2 criterios explicados en la sección 10.7.1. En la **Figura 42** se muestra un ejemplo de muestra real conteniendo clomazone.

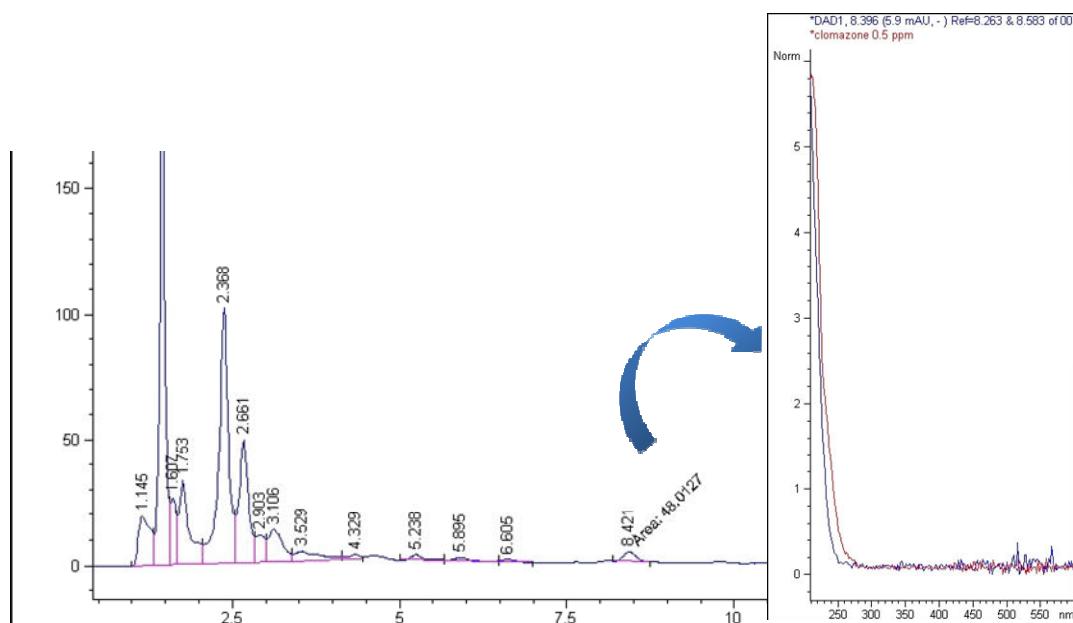


Figura 42. Cromatograma y espectro UV de una muestra real de suelo en donde se detectó clomazone a 56 ± 4 $\mu\text{g/kg}$.

16.5. Conclusiones parciales de los resultados obtenidos para suelo

-Se evaluaron diferentes metodologías para el análisis de residuos de herbicidas en suelo. El método seleccionado es una metodología novedosa que permite determinar simultáneamente 9 herbicidas de post-emergencia muy utilizados en el cultivo de arroz en Uruguay.

-La metodología desarrollada es de bajo costo y pasible de ser aplicada en laboratorios de rutina para la evaluación del impacto ambiental de los herbicidas utilizados en el cultivo de arroz.

-Se demostró que es fundamental tener en cuenta la composición del suelo al momento de seleccionar la metodología de extracción.

-Esta técnica fue aplicada al análisis de muestras reales, detectándose herbicidas comúnmente usados en cultivos de arroz en Uruguay.

Agua de cultivos de arroz

17. Análisis de pesticidas en agua

17.1. Justificación y objetivos

El análisis de residuos de pesticidas en agua es importante para evaluar el impacto del uso de agroquímicos en los cultivos.

En general, los contaminantes en muestras ambientales como el agua se encuentran en baja concentración. Por este motivo para su análisis son necesarias metodologías que impliquen etapas de pre-concentración con el fin de detectarlos e identificarlos correctamente. En la actualidad las metodologías basadas en SPE son ampliamente utilizadas para el tratamiento de muestras acuosas.

En la literatura, existen numerosos artículos que reportan el análisis de residuos de pesticidas en agua mediante LC-DAD pero, en general, dichos métodos están diseñados para un solo analito o para un grupo de compuestos de una misma familia.

En este trabajo se desarrollaron 3 métodos analíticos diferentes para la determinación de residuos de pesticidas en agua proveniente de cultivos de arroz. Las metodologías propuestas en esta sección se diseñaron en un principio buscando evaluar los mismos herbicidas seleccionados para el análisis de suelo. Posteriormente se buscó aumentar el número de compuestos analizados mediante el uso de técnicas analíticas sofisticadas como lo es LC-MS/MS utilizando diferentes analizadores; QqQ y QLIT.

17.2. Desarrollo de metodologías para el análisis de herbicidas en agua de cultivos de arroz mediante LC-DAD

17.2.1. Selección de los herbicidas

Los analitos estudiados en este ensayo fueron los 9 herbicidas de post emergencia ajustados para suelo de cultivos de arroz.

17.2.2. Validación de la metodología

17.2.2.1. Método de extracción y clean-up

Dada las características de la muestra una de las metodologías de rutina más reportadas para el análisis de residuos es la Extracción en Fase Sólida con un

adsorbente adecuado según el tipo de pesticida de interés. En este trabajo se evaluaron dos tipos de adsorbentes, OASIS[®] HLB y C-18, con el fin de seleccionar el adsorbente óptimo para el análisis de los herbicidas de interés.

El ajuste de las condiciones del método mediante SPE, se realizó a partir de una muestra de agua potable fortificada en donde se optimizaron los siguientes parámetros:

- Tipo y volumen de solvente necesario para el acondicionamiento del cartucho y la elución de los analitos. El acondicionamiento se realizó con ACN y agua ajustada a pH 3, mientras que para la elución de los analitos, se probaron diferentes estrategias; 2x1 mL MeOH pH 3, 2x1 mL ACN pH 3, 2x1 mL MeOH pH 3: ACN (1:1), 1 mL MeOH pH 3 + 1 mL ACN; 2x1 mL MeOH pH 3 + 2 mL ACN; 2x1 mL MeOH pH 3 + 1 mL acetona.
- Volumen de muestra para la pre-concentración, depende del tipo y tamaño de cartucho y de la sensibilidad del sistema de detección. El volumen de la muestra fue 250 mL con los cuales se aseguró una adecuada pre-concentración sin la saturación de los sitios activos del adsorbente y con una adecuada detección de los compuestos.
- Tipo de adsorbente. Se comparó la eficiencia en cuanto a la recuperación de los herbicidas en estudio, en ambas matrices, agua potable y agua de cultivos de arroz, de C-18 y OASIS[®] HLB usados comúnmente para el análisis de residuos de pesticidas en agua.⁽²⁵⁹⁾

Para esto se utilizaron 3 muestras de agua potable fortificadas con 0,1; 0,3 y 0,5 µg/L. En la **Figura 43** se observa el cromatograma obtenido a partir de una muestra de agua potable fortificada y extraída mediante SPE con cartuchos OASIS[®] HLB.

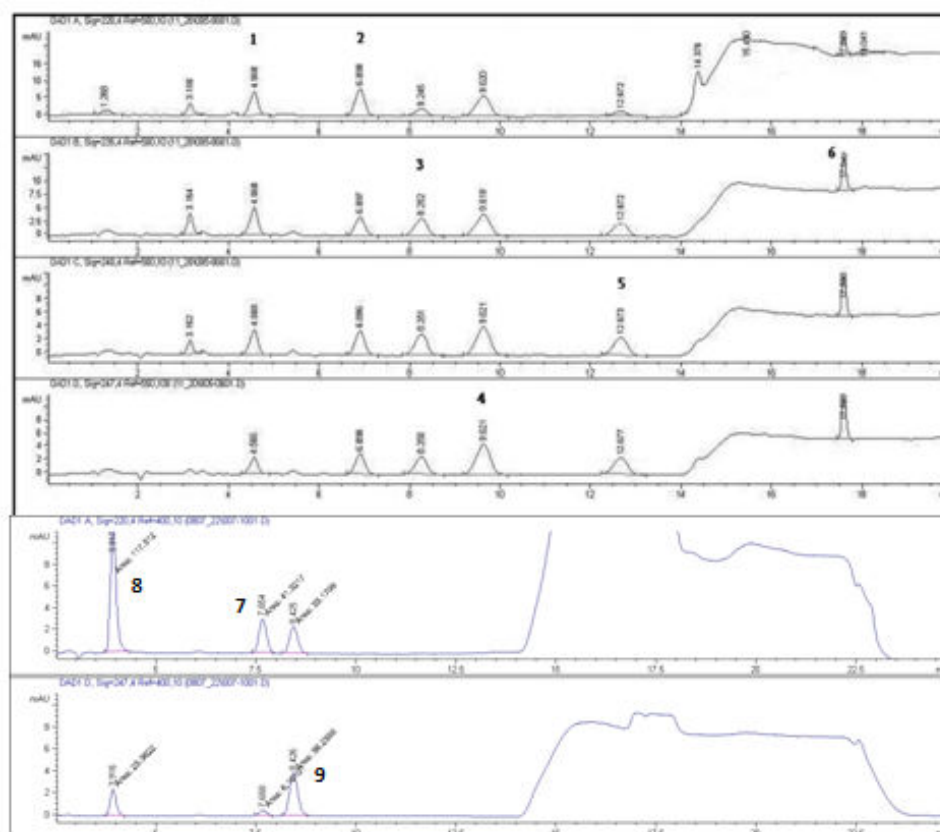


Figura 43. Cromatograma de un extracto de agua a 0,5 µg/L obtenido mediante SPE con cartuchos de OASIS® HLB; (1) metsulfurón-metil, (2) bentazone, (3) bensulfurón-metil, (4) bispiribac sodio, (5) pirazosulfurón-etil, (6) cihalofop-butyl, (7) clomazone, (8) quinclorac, (9) propanil. Cada herbicida está señalado a su respectiva longitud de onda.

17.2.2.2. Estudio de Recuperación

Los % Rec. se evaluaron a partir de muestras blanco, fortificadas en 3 niveles de concentración como se define en la sección **10.7.2**.

En la **Tabla 30** se encuentran los resultados de recuperación y repetitividad para los 3 niveles de concentración evaluados en ambos experimentos; con cartuchos C-18 y OASIS® HLB en agua potable.

Herbicida	Tipo de cartucho	0,1 µg/L % Rec. (% RSD)	0,3 µg/L % Rec. (% RSD)	0,5 µg/L % Rec. (% RSD)
Bensulfurón-metil	C-18	94 (8)	74 (13)	71 (11)
	HLB	82 (7)	79 (9)	63 (7)
Bentazone	C-18	122 (8)	152 (11)	144 (3)
	HLB	120 (8)	120 (8)	109 (8)
Bispiribac sodio	C-18	70 (14)	69 (8)	53 (19)
	HLB	76 (5)	70 (10)	49 (5)
Cihalofof-butil	C-18	122 (6)	47 (17)	44 (6)
	HLB	80 (11)	70 (5)	79 (9)
Metsulfurón-metil	C-18	90 (18)	80 (15)	85 (8)
	HLB	120 (8)	110 (11)	76 (6)
Pirazosulfurón-etil	C-18	90 (13)	92 (15)	79 (10)
	HLB	82 (10)	92 (8)	76 (6)

Tabla 30. Comparación de la performance de 2 cartuchos de SPE para la determinación de los herbicidas de post-emergencia para 0,1; 0,3 y 0,5 µg/L en agua potable, (n=5).

Los mejores resultados, en términos de % Rec. se obtuvieron con 2x1 mL MeOH pH 3 + 2 mL ACN como solvente de elución que son los que se presentan en la **Tabla 30**. Como también se observa en la **Tabla 30** las recuperaciones obtenidas utilizando cartuchos de OASIS® HLB son muy buenas, en el entorno de 70-120% excepto para bispiribac sodio y bensulfurón-metil a 0,5 µg/L. Mientras que el uso de C-18 presentó buenas recuperaciones para bensulfurón-metil, metsulfurón-metil y pirazosulfurón-etil, pero el resto de los pesticidas presentó problemas de recuperación; bajas para cihalofof-butil y bispiribac sodio y relativamente altas para bentazone.

Una vez validada la metodología de análisis en agua potable se evaluaron las mismas metodologías en agua de arroz en 2 niveles de fortificación; 1,0 y 5,0 µg/L. En general todos los resultados, tanto en HLB como en C-18 fueron aceptables aunque el bispiribac sodio no pudo ser analizado y el metsulfurón-metil presentó un bajo % Rec. en cartuchos OASIS® HLB.

En general la eficiencia de ambos cartuchos fue similar, pudiéndose observar mejores recuperaciones para el nivel de 1 µg/L probablemente por la capacidad limitada de los cartuchos de retener compuestos provenientes de una matriz compleja como es el agua de cultivos de arroz.

Una vez validado el método, se evaluó la inclusión de 3 nuevos analitos; clomazone, propanil y quinclorac. Los resultados de la extensión de este método se observan en la **Tabla 31**.

Herbicida	Tipo de cartucho	1 µg/L % Rec. (% RSD)	5 µg/L % Rec. (% RSD)
Bensulfurón-metil	C-18	109 (0,1)	89 (4)
	HLB	82 (12)	96 (1)
Bentazone	C-18	100 (0,7)	87 (0,3)
	HLB	90 (11)	91 (2)
Bispiribac sodio	C-18	N.D.	39 (2)
	HLB	N.D.	43 (9)
Cihalofof-butil	C-18	90 (7)	88 (5)
	HLB	73 (24)	80 (5)
Metsulfurón-metil	C-18	102 (5)	68 (27)
	HLB	47 (1)	78 (3)
Pirazosulfurón-etil	C-18	104 (5)	85 (4)
	HLB	81 (21)	91 (2)
Clomazone	C-18	124 (20)	91 (15)
Propanil	C-18	75 (7)	74 (2)
Quinclorac	C-18	75 (16)	74 (2)

Tabla 31. Comparación de la performance de 2 cartuchos de SPE para la determinación de los herbicidas de post-emergencia a 1 y 5 µg/L en agua de cultivos de arroz, (n=5). N.D.; No Detectado.

17.2.2.3. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

En agua potable la repetitividad fue para ambos métodos menor a 19%, mientras que para agua de arroz fue en general adecuada excepto para el cihalofof-butil y el metsulfurón-metil que presentaron RSD > 20% a 1,0 y 5,0 µg/L respectivamente. La diferencia entre los valores obtenidos se puede deber principalmente a que el agua de cultivos de arroz presenta una mayor complejidad en cuanto a su composición, pudiendo contener un mayor número de interferencias que el agua potable y éstas pueden no ser completamente eliminadas durante el procedimiento de extracción y clean-up mediante SPE.

En general los resultados de reproducibilidad intra-laboratorio cumplen con los valores sugeridos por la DG SANCO en las dos matrices evaluadas.⁽²³³⁾

17.2.2.4. Linealidad

La respuesta de los analitos se evaluó en agua potable en el rango de 0,125 a 10 mg/L y en agua de arroz según el LOQ de los herbicidas, los rangos de linealidad fueron 0,3 a 1000 µg/L, 0,5 a 1000 µg/L y 1 a 1000 µg/L, presentando comportamiento lineal en todos los casos, con $r^2 > 0,998$. (**Tabla 32**).

Resultados y Discusión

Herbicida	Agua potable		Agua de arroz					
	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Ecuación de calibración (HLB)	r ²	Ecuación de calibración (C-18)	r ²
Bensulfurón-metil	0,03	0,1	0,3	1,0	y= 61,447x – 1.6489	0,9992	y = 52,609x - 0,4996	0,9992
Bentazone	0,03	0,1	0,3	1,0	y= 112,46x + 0.3271	0,9999	y = 96,963x - 0,1516	0,9997
Bispiribac sodio	0,04	0,1	1,7	5,0	y= 94,692x – 2.0941	0,9992	y = 29,051x + 0,5169	0,9995
Cihalofof-butyl	0,03	0,1	0,3	1,0	y= 42,623x – 0.38	0,9998	y = 39,703x + 1,7761	0,9998
Metsulfurón-metil	0,03	0,1	1,7	5,0	y= 88,718x – 1.7754	0,9997	y = 80,371x + 0,8409	0,9996
Pirazosulfurón-etil	0,03	0,1	0,3	1,0	y= 67,328x – 8.2178	0,9989	y = 69,417x - 2,7538	0,9990
Clomazone	-	-	0,1	0,3	-	-	y = 81,822x - 2,714	0,9978
Propanil	-	-	0,1	0,3	-	-	y = 110,5x - 7,7573	0,9978
Quinclorac	-	-	0,1	0,1	-	-	y = 222,82x - 7,5064	0,9983

Tabla 32. Límites de detección, cuantificación y linealidad de los diferentes herbicidas obtenidos en ambas matrices mediante SPE con cartuchos OASIS[®] HLB y C-18.

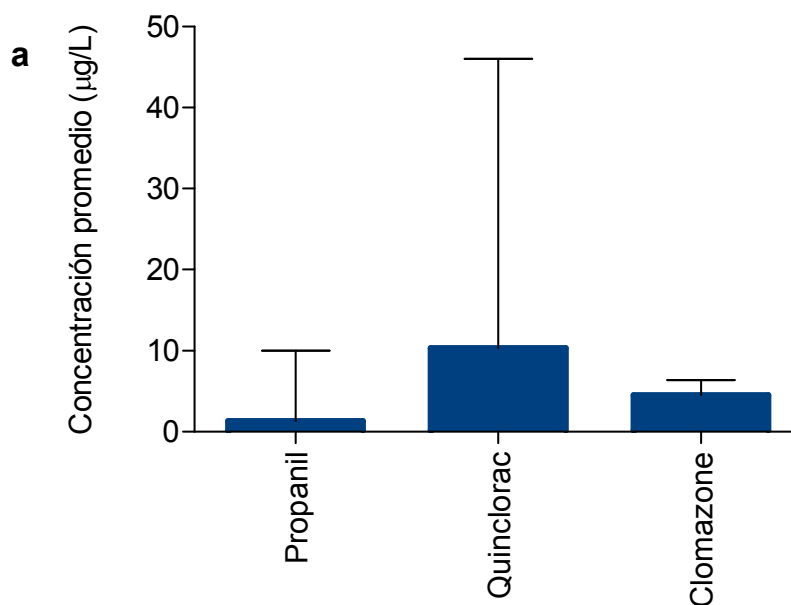
17.2.2.5. LOD y LOQ

Ambos métodos de SPE (HLB y C-18) presentaron límites de detección y de cuantificación iguales para cada una de las matrices (**Tabla 32**). Los LOD en agua potable son 25 veces menores que en agua de arroz, en general son del orden de los reportados en agua por otros autores.^(174,221)

17.2.2.6. Análisis de muestras reales

El análisis de las muestras reales se realizó con cartuchos de C-18 teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y sumado a la gran diferencia en el costo de los cartuchos.

Se analizaron más de 100 muestras de las cuales 12 presentaron propanil, 3 quinclorac y en 2 se detectaron residuos de clomazone. La **Figura 44 a** muestra las concentraciones promedio detectadas en las muestras analizadas y en la **Figura 44 b** se presenta un ejemplo de agua de cultivo de arroz en la que se detectó clomazone.



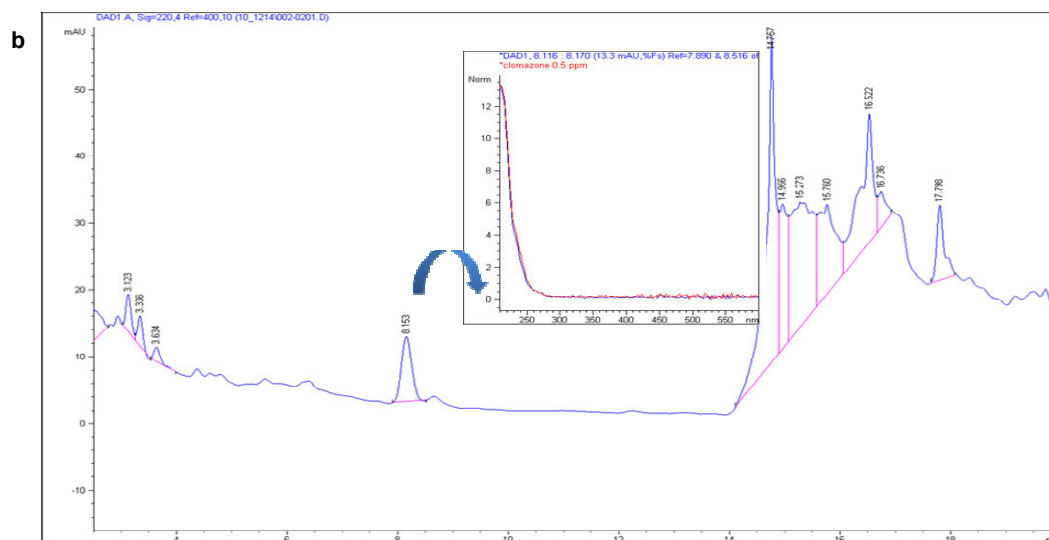


Figura 44 a. Concentración promedio en $\mu\text{g/L}$ de los herbicidas detectados en aguas de cultivos de arroz. **b.** Muestra real de agua en la que se detectó clomazone.

17.2.3. Conclusiones parciales de los resultados obtenidos para agua mediante LC-DAD.

-Se validó una metodología para el análisis simultáneo de 9 herbicidas de post-emergencia con LODs acordes a las reglamentaciones ambientales internacionales en cuanto al nivel de residuos de pesticidas en agua que establecen como criterio que la suma total de pesticidas no debe ser mayor a $0,5 \mu\text{g/L}$.

-Las metodologías de SPE evaluadas presentaron en general cifras de mérito acordes a las reglamentaciones de calidad de agua por lo que constituyen un insumo para el control de residuos de herbicidas en agua.

-La metodología desarrollada puede aplicarse al análisis de cualquier otro tipo de agua proveniente de otros agro-ecosistemas y permite la evaluación del impacto generado por el uso de estos herbicidas en zonas agrícolas con manejo intensivo.

-La metodología desarrollada es fácilmente adaptable en los laboratorios de control ambiental, de costo relativamente bajo y fácil de reproducir. Además permitiría la inclusión de otros herbicidas en el mismo análisis.*

**Actualmente este método se ha expandido para la determinación de 12 herbicidas de uso habitual en cultivos de arroz.*

17.3. Validación de métodos de análisis de pesticidas en agua de cultivos de arroz mediante LC-QqQ/MS

El principal objetivo de este experimento fue aumentar el número de analitos y aumentar la sensibilidad del método de análisis detallado en la sección **17.2**, aplicando metodologías de última generación; en particular la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, utilizando en este caso un QqQ como analizador (LC-QqQ/MS).

17.3.1. Selección de los pesticidas

Se incluyeron los pesticidas más usados a nivel mundial para cultivos de arroz.^(4,19) En total se eligieron 51 compuestos pertenecientes a diferentes clases químicas, tales como fenilureas, estrobilurinas, organofosforados, carbamatos, ureas, triazoles, fenoxiácidos, incluyendo alguno de sus metabolitos (**Tabla 33**). Según la regulación de la Unión Europea algunos de estos pesticidas están prohibidos, como el propanil, el bromacilo, el imazapir o el bentazone que es considerado una sustancia prioritaria en agua. Otros pesticidas ni siquiera están incluidos en esta normativa, por lo que por defecto están prohibidos. Sin embargo, algunos de estos pesticidas se utilizan normalmente en Uruguay para arroz.⁽¹¹⁹⁾ Para la selección de dichos compuestos se siguieron 3 criterios: 1)- aquellos pesticidas que poseen LMR fijados por el *Codex Alimentarius* para arroz⁽¹⁰⁸⁾, 2)-pesticidas más usados en cultivos de arroz y 3)-aquellos pesticidas que fueron encontrados en diferentes commodities de arroz según la base de datos “www.pesticides-online.com/” en el período 2000-2010.^(113,120)

17.3.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

Una de las primeras etapas durante el desarrollo del método cromatográfico es la selección de las condiciones de trabajo del HPLC; tipo de fase móvil, flujo de fase móvil, volumen de inyección y temperatura de la columna.

Con respecto a la temperatura de la columna, para evitar la posible degradación de los pesticidas se trabajó a temperatura ambiente.

Se utilizaron las FM C y D definidas en la sección **10.5.2**. El ácido fórmico actúa como un modificador mejorando la sensibilidad y resolución de los iones en la fuente de ionización. Se realizaron diferentes inyecciones con diferentes proporciones de estas FM de forma de optimizar el programa de gradiente a utilizar tanto para el modo positivo como el modo negativo. Por otro lado se evaluaron 2 flujos de FM; 0,4 y 0,6 mL/min, pero no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a resolución y sensibilidad salvo el aumento en el tiempo de análisis para el flujo 0,4 mL/min, por lo que se trabajó a 0,6 mL/min. El volumen de inyección fue 10 µL, suficiente para alcanzar una buena sensibilidad. Los mejores resultados se presentan en la sección **10.5.2**.

17.3.3. Optimización de las condiciones SRM

Según la normativa de la UE para lograr una correcta identificación y confirmación de los analitos mediante LC-MS/MS es necesario la optimización de dos transiciones (SRM) por compuesto.⁽²⁷²⁾ Por lo que se optimizó el ión precursor y dos iones fragmento, de forma que la transición menos intensa (SRM2) se utilizó para la confirmación mientras que la más abundante (SRM1) se usó para la cuantificación de los analitos de interés. El criterio de confirmación utilizado para cada compuesto fue el recomendado por la DG SANCO, que se basa en la presencia de ambas transiciones al mismo tiempo de retención, la coincidencia del t_R de estas transiciones con las de un estándar y además la relación (SRM2/SRM1) en la muestra problema debe coincidir con la relación (SRM2/SRM1) obtenida para el estándar.⁽²⁷²⁾ Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros optimizados, junto con la relación entre las transiciones y su correspondiente RSD se presentan en la **Tabla 34**.

En relación a los iones fragmento seleccionados, en general fueron todos mayores que m/z 100, excepto para clomazone, malatión, molinato, tebuconazol, triadimenol y triflumizol en donde uno de los fragmentos fue menor que 80. El usar m/z bajos, representa una desventaja, ya que disminuye la especificidad, sin embargo se seleccionaron esos iones porque los fragmentos encontrados no eran lo suficientemente sensibles. El herbicida quinclorac no se pudo optimizar, debido a que no fue posible obtener 2 transiciones. Sin embargo se incluyó en el método dado que este herbicida es uno de los compuestos más usados en cultivos de arroz. De esta forma, ante la presencia de una muestra positiva sería necesario utilizar otro método de análisis para su confirmación. Por otro lado, como se observa en la **Tabla 34**, 9 compuestos presentaron una diferencia de intensidad en ambas transiciones de hasta 10 veces. Esto constituye una desventaja al momento de identificación de los compuestos principalmente a concentraciones bajas en donde la relación S/N debe ser mayor que 3 para la correcta confirmación del analito. La **Figura 45** muestra el cromatograma de iones totales (TIC, Total Ion Chromatogram) conteniendo todas las transiciones de los pesticidas en estudio a 0,5 µg/L, en los dos modos utilizados; modo positivo y negativo.

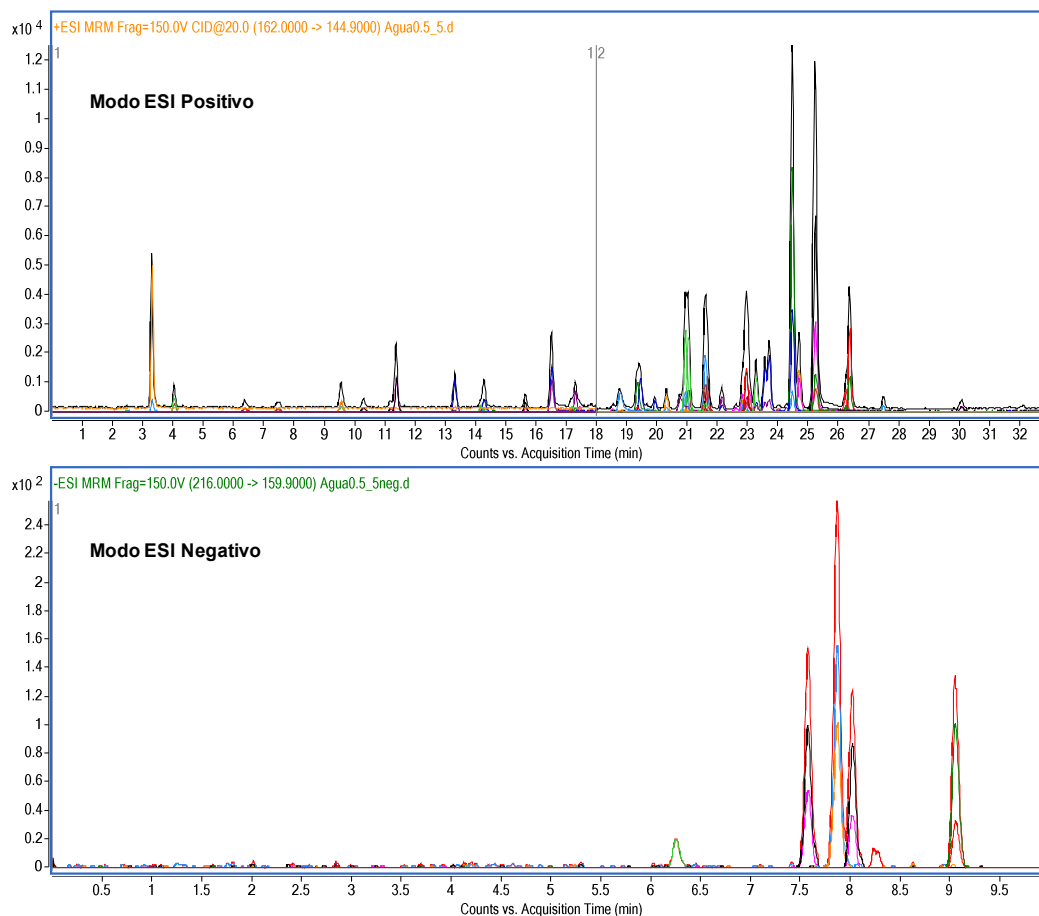


Figura 45. TIC del mix de pesticidas a 0,5 µg/L incluidos en la **Tabla 33**, obtenidos mediante los métodos descritos en la sección **10.5.2**.

17.3.4. Validación de la metodología

17.3.4.1. Método de extracción y clean-up

El método utilizado para el análisis de agua de cultivos de arroz mediante LC-QqQ/MS se describe en la sección **12.3.6**. Básicamente fue el desarrollado para el análisis de los 9 herbicidas utilizando la técnica de SPE con cartuchos OASIS[®] HLB mediante LC-DAD, con las siguientes variaciones:

-El volumen de agua de cultivo de arroz utilizado fue 100 mL, este cambio en el volumen de muestra se realizó teniendo en cuenta la mayor sensibilidad presentada por el detector de masas comparada con la del DAD y para evitar posibles efectos de la matriz debido a la pre-concentración.

-Luego de la elución de los analitos con 2x1 mL de MeOH a pH 3 y 2x1 mL de ACN se concentró en atmósfera de nitrógeno y el extracto obtenido se re-disolvió en 1mL de ACN, en lugar de 0,2 mL usados para el análisis mediante LC-DAD. De esta forma el factor de pre-concentración se reduce a 100; 125 veces menor que en el método anterior.

17.3.4.2. Estudio de Recuperación

El % Rec. se determinó a partir de agua de cultivos arroz fortificada a 0,5; 1,0; y 5,0 µg/L utilizando el método de extracción y clean-up descrito en la sección 12.3.6. En la **Tabla 33** se presentan los resultados obtenidos para los 3 niveles de concentración evaluados. Como se puede observar, los % Rec. se encuentran en el rango de 70-120%, excepto algún pesticida como carbendazím, imidacloprid, molinato, propaquizafop, piraclostrobín y tiametoxam que presentan problemas en alguno de los niveles de concentración estudiados. Aún así, estos % Rec. pueden considerarse aceptables teniendo en cuenta que este comportamiento se observó para un sólo nivel de concentración. Otros tres pesticidas; diazinón, tiofanato-etil y triflumizol, presentaron bajas recuperaciones en los tres niveles evaluados, por lo que no se incluyeron en el método. Una posible explicación de estas bajas recuperaciones puede ser la alta supresión de la señal observada para estos compuestos (42-66%). El quinclorac no pudo confirmarse. Finalmente el método se validó para 48 compuestos.

Pesticida	% Rec. (% RSD) 0,5 µg/L	% Rec. (% RSD) 1 µg/L	% Rec. (% RSD) 5 µg/L
Azimsulfurón	101 (11)	81 (6)	81 (2)
Azoxistrobín	102 (5)	87 (4)	84 (7)
Bentazone	91 (11)	123 (2)	87 (5)
Bispiribac sodio	91 (21)	88 (12)	88 (12)
Bromacilo	88 (9)	83 (5)	101 (2)
Carbaril	109 (16)	91 (8)	119 (1)
Carbendazím	94 (9)	58 (1)	91 (6)
Carbofurán	96 (18)	92 (2)	104 (6)
Clomazone	86 (14)	98 (6)	86 (5)
Diazinón	< 50 (-)	< 50 (-)	< 50 (-)

Difenoconazol	93 (16)	91 (5)	70 (8)
Diflubenzurón	106 (14)	78 (13)	84 (6)
Dimetoato	116 (9)	74 (6)	95 (16)
Edifenfos	123 (13)	112 (10)	110 (7)
Epoxiconazol	93 (14)	86 (18)	70 (3)
Etiofencarb	77 (20)	75 (18)	71 (9)
Fipronil	94 (12)	127 (15)	79 (7)
Fluroxipir	93 (20)	69 (4)	90 (6)
Flutolanil	104 (13)	78 (13)	95 (5)
Imazapic	107 (12)	85 (2)	98 (4)
Imazaquín	94 (13)	85 (2)	89 (4)
Imazapir	103 (10)	83 (3)	96 (2)
Imazosulfurón	67 (20)	85 (1)	70 (8)
Imidacloprid	100 (14)	63 (12)	85 (4)
Kresoxim-metil	65 (15)	87 (9)	84 (11)
Malatión	112 (14)	94 (1)	110 (6)
Metsulfurón-metil	94 (15)	79 (10)	71 (6)
Molinato	100 (4)	61 (4)	110 (8)
Oxydemeton-metil	118 (8)	78 (3)	100 (3)
Picoxistrobín	89 (11)	77 (21)	99 (5)
Pirazosulfurón-etil	118 (12)	92 (8)	83 (6)
Pirimifós-metil	78 (13)	112 (10)	73 (3)
Piridafentión	121 (13)	76 (4)	93 (3)
Propanil	83 (10)	70 (20)	74 (5)
Propaquizafop	90 (18)	100 (14)	68 (9)
Propiconazol	113 (17)	82 (14)	70 (6)
Piraclostrobín	96 (14)	65 (3)	75 (6)
Quinclorac*	107 (14)	116 (4)	86 (6)
Tebuconazol	101 (14)	75 (13)	72 (5)
Temefós	78 (19)	75 (6)	85 (10)
Tiacloprid	107 (16)	95 (3)	81 (3)
Tiametoxam	127 (15)	64 (2)	79 (4)
Tiofanato-etil	< 50 (-)	< 50 (-)	< 50 (-)
Triadimefón	111 (14)	91 (9)	73 (4)
Triadimenol	113 (9)	87 (13)	77 (4)
Triciclazol	104 (11)	96 (10)	95 (3)
Trifloxistrobín	86 (14)	88 (0,6)	114 (6)
Triflumizol	< 50 (-)	< 50 (-)	< 50 (-)
Triflumurón	97 (15)	97 (20)	70 (9)
2,4-D	81 (11)	81 (4)	79 (4)
3,4-dicloroanilina	75 (12)	71 (14)	80 (7)

Tabla 33. %Rec. y % RSD obtenidos con el método desarrollado a los diferentes niveles de fortificación evaluados, (n=5). * El % Rec. fue calculado en base a la respuesta obtenida con la señal de cuantificación, pero como se mencionó anteriormente con el sistema cromatográfico y de detección utilizado no puede ser confirmado.

17.3.4.3. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

Como se muestra en la **Tabla 33**, la repetitividad, evaluada a los tres niveles de concentración fue 1-20% mientras que la reproducibilidad evaluada en los mismos niveles de concentración durante 5 días consecutivos fue en promedio menor que 18%.

17.3.4.4. LOD y LOQ

En general a 5 µg/L, la relación S/N en agua de arroz para la mayoría de los pesticidas fue mayor que 3, por lo que se decidió tomar el valor de 5 µg/L como LOD instrumental. Dado que durante la etapa de clean-up la muestra se concentra en un factor de 100, el LOD del método se estimó en 0,05 µg/L en agua de arroz. Solamente 5 compuestos presentaron una relación S/N mayor que 3 para los cuales se fijó un LOD mayor; estos pesticidas fueron bispiribac sodio, fluroxipir y triadimenol (10 µg/L), kresoxim-metil (50 µg/L). Todos los plaguicidas excepto el carbaril presentaron relaciones S/N mayores que 10 a sus respectivos LOD por lo que el LOQ fue igual al LOD, mientras que el LOQ del carbaril fue de 10 µg/L.

17.3.4.5. Linealidad

En general el comportamiento de los pesticidas fue lineal, con r^2 mayores a 0,99 como se observa en la **Tabla 34**, en el rango 5-1000 µg/L tanto en solvente como en matriz. Algunos compuestos, como el bensulfurón-metil, cihalofop-butil, iprodiona, procloraz y tebufenozide, presentaron un comportamiento no lineal en el rango de trabajo, siendo excluidos del método. El bispiribac sodio, fluroxipir, y triadimenol presentaron comportamiento lineal en el rango 10-750 µg/L y el kresoxim metil entre 50 y 750 µg/L.

Resultados y Discusión

Pesticida	LOD (µg/L)	Ecuación de calibración	r ²	Pendiente matriz/Pendiente solvente	% SRM2/SRM1 (% RSD)
Azimsulfurón	0,05	y = 219,03x + 1406,5	0,9984	0,57	22 (0,1)
Azoxistrobín	0,05	y = 832,93x + 11050	0,9941	0,80	32 (3)
Bentazone	0,05	y = 46,287x + 552,13	0,9955	1,70	68 (7)
Bispiribac sodio	0,10	y = 34,209x - 83,384	0,9998	0,90	56 (14)
Bromacilo	0,05	y = 81,722x + 1019,6	0,9949	0,58	15 (8)
Carbaril	0,05	y = 82,298x - 69,339	0,9942	0,81	35 (4)
Carbendazím	0,05	y = 1457,5x + 16113	0,9926	0,70	8 (4)
Carbofurán	0,05	y = 766,4x + 6431,7	0,9966	0,77	68 (4)
Clomazone	0,05	y = 604,59x + 4001,3	0,9977	0,77	14 (9)
Diazinón	-	y = 3242,2x + 29673	0,9956	0,34	62 (3)
Difenoconazol	0,05	y = 1389,1x + 12035	0,9984	0,63	19 (3)
Diflubenzurón	0,05	y = 148,6x + 1667	0,9957	0,68	45 (10)
Dimetoato	0,05	y = 127,46x + 1630,2	0,9937	0,57	100 (8)
Edifenfos	0,05	y = 382,56x + 2231,4	0,9993	0,87	19 (7)
Epoxiconazol	0,05	y = 1219,3x + 9170,7	0,9987	0,81	25 (3)
Etiofencarb	0,05	y = 403,99x + 2632,4	0,9980	0,90	12 (9)
Fipronil	0,05	y = 50,283x + 472,14	0,9984	0,65	7 (13)
Fluroxipir	0,10	y = 13,597x + 18,731	0,9995	0,85	94 (6)
Flutolanil	0,05	y = 526,69x + 6249,1	0,9953	0,76	86 (2)
Imazapic	0,05	y = 184,01x + 489,67	0,9988	0,77	75 (6)
Imazapir	0,05	y = 68,998x + 252,03	0,9997	0,79	81 (11)
Imazaquín	0,05	y = 206,97x + 453,75	0,9996	0,72	11 (6)
Imazosulfurón	0,05	y = 27,213x + 207,04	0,9957	0,45	56 (14)
Imidacloprid	0,05	y = 55,237x + 553,72	0,9942	0,45	97 (7)
Kresoxim-metil	0,50	y = 37,268x + 574,77	0,9901	0,69	3 (20)
Malatión	0,05	y = 227,7x + 842,06	0,9996	1,11	59 (8)
Metsulfurón-metil	0,05	y = 139,95x + 12,712	0,9998	0,46	63 (5)

Resultados y Discusión

Molinato	0,05	$y = 226,09x + 420,6$	0,9999	0,88	73 (7)
Oxidemetón-metil	0,05	$y = 140,76x + 1178,4$	0,9978	0,82	54 (7)
Picoxistrobín	0,05	$y = 2581x + 55856$	0,9982	0,78	41 (3)
Pirazosulfurón-etil	0,05	$y = 253,87x - 119,14$	0,9999	0,68	30 (5)
Pirimifós-metil	0,05	$y = 4843,4x + 32798$	0,9980	0,87	44 (3)
Piridafentión	0,05	$y = 405,95x + 4374,3$	0,9972	0,76	53 (8)
Propanil	0,05	$y = 36,499x + 333,91$	0,9967	0,81	28 (0,1)
Propaquizafop	0,05	$y = 289,56x + 1723,3$	0,9964	0,58	26 (7)
Propiconazol	0,05	$y = 298,29x + 1672,5$	0,9975	0,83	38 (2)
Piraclostrobín	0,05	$y = 403,29x + 7623,9$	0,9926	0,68	83 (3)
Quinclorac	0,50	$y = 37,572x + 115,85$	0,9993	1,06	1 (13)
Tebuconazol	0,05	$y = 826,89x + 5075$	0,9991	1,23	6 (9)
Temefós	0,05	$y = 97,945x + 916,63$	0,9924	0,51	97 (5)
Tiacloprid	0,05	$y = 351,88x + 4667,4$	0,9939	0,39	5 (18)
Tiametoxam	0,05	$y = 36,621x + 484,81$	0,9931	0,45	100 (10)
Tiofanato-etil	-	$y = 554,55x + 9962,4$	0,9903	0,58	9 (6)
Triadimefón	0,05	$y = 337x + 2630$	0,9975	0,84	30 (4)
Triadimenol	0,10	$y = 418,62x + 3621,8$	0,9979	0,76	10 (4)
Triciclazol	0,05	$y = 1005,1x + 4131,8$	0,9994	1,13	101 (4)
Trifloxistrobín	0,05	$y = 689,45x + 11614$	0,9967	0,54	43 (6)
Triflumizol	-	$y = 1005,1x + 4131,8$	0,9994	0,58	31 (3)
Triflumurón	0,05	$y = 51,703x + 347,45$	0,9979	0,59	43 (4)
2,4-D	0,05	$y = 30,546x + 143,45$	0,9976	0,90	43 (0,1)
3,4-dicloroanilina	0,05	$y = 773,37x - 323,13$	0,9999	1,09	6 (11)

Resultados y Discusión

Tabla 34. LOD, ecuación de calibración, coeficiente de correlación (r^2), relación de las pendientes obtenidas en matriz y solvente y relación SRM2/SRM1 del método desarrollado mediante LC-QqQ/MS.

17.3.4.6. Efecto Matriz

El efecto matriz, ya sea aumento o supresión de la señal constituye uno de los mayores problemas durante el análisis de trazas mediante LC-ESI/MS. Los co-extractivos de la matriz que sufran ionización simultáneamente con los compuestos de interés pueden comprometer la cuantificación de los compuestos, especialmente de aquellos que se encuentran en baja concentración, afectando la exactitud y reproducibilidad de la medida. En la literatura existen varios métodos para solucionar este problema, pero el más usado es el uso de curvas de calibración en matriz (matrix-matched) para realizar la cuantificación de los analitos.⁽²¹⁴⁾

El agua de cultivos de arroz es una matriz compleja, sumado al hecho de que la técnica SPE implica un paso de pre-concentración es de esperar que exista efecto de la matriz. Cuantificando dicho efecto matriz por medio de la **Ecuación 2** se determina si existe un aumento de la señal (si la diferencia entre las pendientes del estándar en matriz y en solvente es positiva) o supresión de la señal (si esta relación es negativa) y además se puede evaluar la magnitud de dicho EM tal como se describe en la sección **7.1**.

Como se observa en la **Figura 46**, en este ensayo aproximadamente el 49% de los analitos estudiados presentó EM, principalmente supresión de la señal, el más común en los sistemas LC-MS/MS. Los pesticidas diazinón, imazosulfurón, tiametoxam y tiacloprid presentaron una supresión de la señal fuerte, mientras que bentazone, presentó un aumento de la señal muy pronunciado. En el resto de los pesticidas se observó un efecto matriz medio a leve.

■ Sin efecto matriz ■ Aumento de señal ■ Supresión de señal

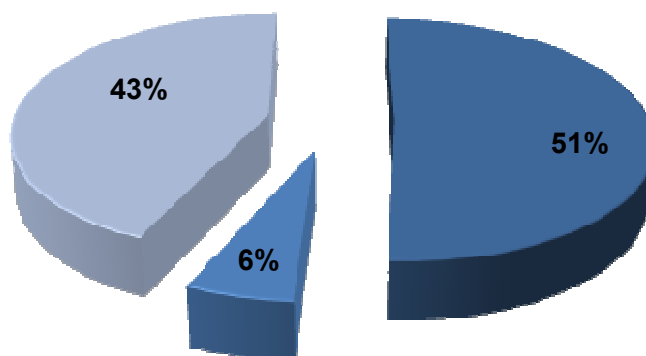


Figura 46. Porcentaje de pesticidas que presentaron efecto matriz, medio, alto o nulo.

17.3.4.7. Especificidad

De acuerdo a lo detallado en la sección 7.2, la regulación Europea y la DG SANCO establecen entre otros, que para una correcta identificación de los pesticidas en estudio la relación (SRM2/SRM1) de cada pesticida en la muestra problema debe coincidir con la relación (SRM2/SRM1) obtenida para el estándar.^(233,272) En este experimento se calculó dicha relación para cada uno de los pesticidas en estudio para cada uno de los puntos de la curva de calibración (25-1000 µg/L) en matriz y se calculó el promedio de estos con su respectiva RSD (**Tabla 34**). La tolerancia máxima permitida en caso de que existan diferencias entre estas relaciones varía según las intensidades relativas entre 20 a 50%.⁽²³³⁾

Además se tomaron en cuenta los otros criterios establecidos por esta guía, la presencia de ambas transiciones al mismo tiempo de retención y la coincidencia del t_R de estas transiciones con las de un estándar. Finalmente se validó esta metodología para 48 pesticidas que cumplen con los requisitos establecidos por la DG SANCO.

17.3.4.8. Ensayo de dilución de la matriz

A partir de los resultados de recuperación y efecto matriz, en donde se observó una alta incidencia de supresión de la señal, se evaluó una variación de método de extracción y clean-up por SPE (para evitar problemas durante la identificación y cuantificación de los analitos de interés). Esta variación consistió en el pasaje de 50 mL de agua de arroz, fortificada al nivel de 1 µg/L en lugar de 100 mL.

De los 48 compuestos estudiados, 22 presentaron % de Rec bajos comparados con el método original, 22 analitos presentaron resultados comparables y sólo 4 compuestos presentaron mejores recuperaciones. Por lo que se decidió continuar con el método original (100 mL).

17.4. Conclusiones parciales del método desarrollado mediante LC-QqQ/MS

-La metodología desarrollada permitió la determinación de 48 residuos de pesticidas en agua provenientes de cultivos de arroz, ampliamente usados a nivel mundial en un solo análisis a niveles de concentración acordes a las reglamentaciones ambientales internacionales para la detección de residuos de pesticidas en agua que establecen como criterio que la suma total de pesticidas no debe ser mayor a 0,5 µg/L.

-El uso de la espectrometría de masas permitió aumentar el número de residuos de pesticidas en un mismo análisis y además fue posible disminuir los LOD en un factor de 10 trabajando incluso con un factor de pre-concentración menor que el usado en el análisis de residuos de herbicidas mediante LC-DAD.

-Dado que el QqQ es un instrumento moderno de elección en muchos laboratorios para el análisis de rutina de residuos de pesticidas, la metodología validada es una herramienta muy útil a incorporar a la hora de monitorear residuos de pesticidas en diferentes ecosistemas agrícolas.

17.5. Validación de método de análisis de pesticidas en agua de cultivos de arroz mediante LC-QLIT/MS

La inyección directa de muestras de agua, actualmente se ha convertido en una técnica atractiva para sustituir las técnicas tradicionales de análisis de agua tales como LLE o SPE.⁽¹³⁹⁾ En este trabajo, aprovechando la alta tecnología de los nuevos equipos de cromatografía líquida acoplados a espectrómetros de masa, que brindan elevada sensibilidad, se ajustó una metodología multi-residuo para el análisis de 70 pesticidas de diferentes clases químicas en agua de cultivos de arroz mediante la técnica “dilute-and-shoot”. Esta técnica implica la inyección directa en columna cromatográfica sin realizar el clean-up y la pre-concentración de la muestra que generalmente es el cuello de botella en todos los laboratorios de análisis de residuos en matrices acuosas. Por otra parte la ausencia de etapas de concentración hace que existan menos co-extractivos en el extracto final. Esta técnica además requiere una mínima manipulación de la matriz, bajo consumo de solventes, menor costo y mayor reproducibilidad.

Hasta hace unos años el uso de la inyección directa no era apropiado, ya que la sensibilidad de los equipos no era lo suficientemente elevada. En la actualidad se han desarrollado equipos de excelente sensibilidad que permiten el análisis de muestras de agua directamente, alcanzando límites de detección del orden de los $\mu\text{g/L}$ e incluso para compuestos altamente sensibles de ng/L . En este trabajo se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a un triple cuadrupolo con trampa de iones lineal, QTRAP 5500.

17.5.1. Selección de los pesticidas

La selección de los analitos de interés se realizó con el fin de desarrollar una metodología apta para el análisis de aguas provenientes de la agricultura en general, no sólo del cultivo de arroz.^(4,69)

El total de los pesticidas en estudio se presentan en la **Tabla 36**.

17.5.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

Se optimizaron el tipo de fase móvil, flujo de fase móvil y volumen de inyección. Se realizaron diferentes experimentos con diferentes proporciones de FM G y H de la sección **10.5.4** del Experimental, de forma de optimizar el programa de gradiente a utilizar tanto para el modo positivo como el modo negativo. Los mejores resultados fueron se presentan en la sección **10.5.4**.

17.5.3. Optimización de las condiciones SRM

En este trabajo se optimizaron las SRM de la misma forma en que se detalló para el análisis de agua mediante LC-QqQ/MS. Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros optimizados, junto con la relación entre las transiciones y su correspondiente RSD se encuentran en la **Tabla 23**.

En relación a los iones fragmento seleccionados, en general fueron todos mayores que m/z 100, excepto para clorotolurón, clomazone, ciproconazol, difenoxurón, diurón, fenurón, hexaconazol, isoprocarb, isoproturón, malatión, molinato, pirimicarb, tebuconazol, tetraconazol, tiodicarb, triadimenol y triflumizol en donde uno de los fragmentos fue menor que 100. Como se discutió anteriormente el usar m/z bajos, representa una desventaja, ya que disminuye la especificidad, sin embargo para estos compuestos sólo se obtuvieron esos iones, ya que el resto de los fragmentos encontrados no eran lo suficientemente sensibles.⁽²⁷³⁾ Por otro lado, como se observa en la **Tabla 36**, algunos compuestos también presentaron una diferencia de intensidad en ambas transiciones de hasta 10 veces al igual que lo observado en LC-QqQ/MS. La **Figura 47** muestra un cromatograma conteniendo todas las transiciones de los pesticidas en estudio a 10 µg/L en agua de cultivos de arroz (XIC, Extracted Ion Chromatogram).

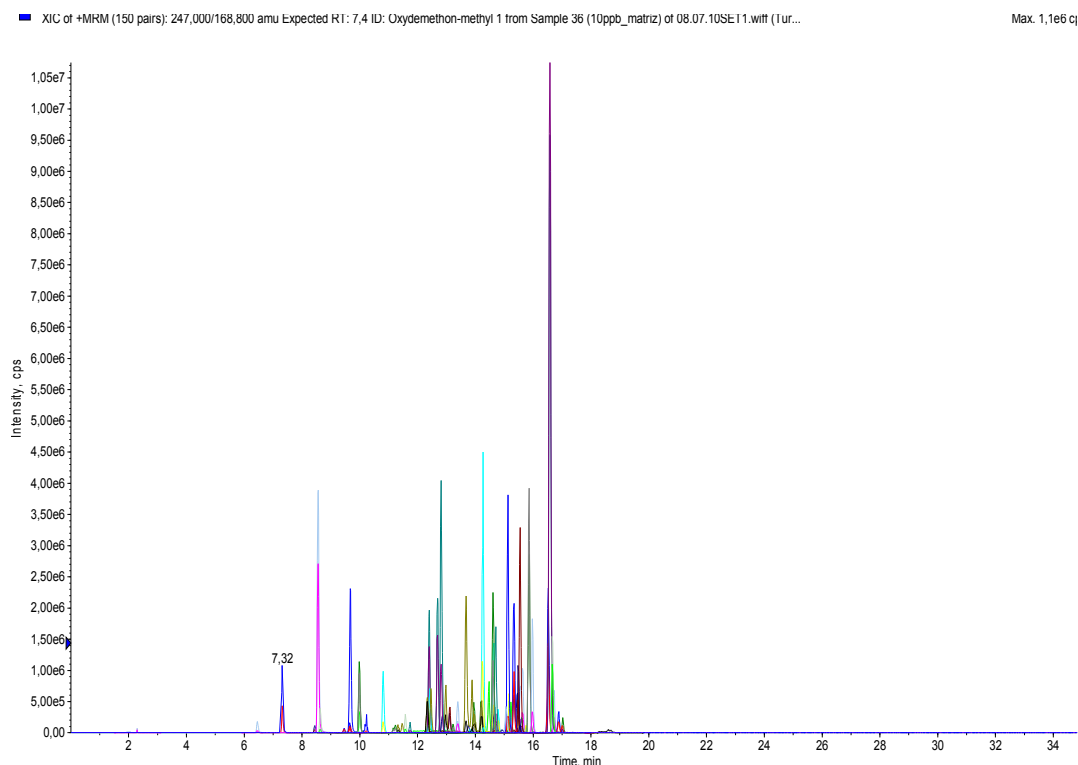


Figura 47. Cromatograma de iones totales de todos los pesticidas analizados en agua de cultivo de arroz a 10 µg/L.

17.5.4. Condiciones del modo IDA (Information-Dependent-Acquisition)

La confirmación del herbicida quinclorac en agua, aplicando un método MRM no fue posible, debido a que no se logró obtener una segunda transición de dicho compuesto pudiéndose determinar sólo una SRM. Las guías europeas de control de calidad en LC-MS/MS establecen que para la correcta confirmación de un pesticida se debe contar con al menos dos transiciones y en caso contrario contar con algún método que otorgue información adicional para la correcta identificación.⁽²³³⁾ Por este motivo fue necesario desarrollar un experimento IDA en modo positivo, combinando el monitoreo de una transición SRM con el modo EPI en una misma inyección, tal como se muestra en la **Figura 48**.

En este caso, el criterio de confirmación del analito en las muestras reales fue la presencia de la transición del quinclorac, en su correcto tiempo de retención y al menos un 70% de concordancia con el espectro de referencia previamente

obtenido como se describe en la sección **10.5.4.1**. El espectro obtenido fue almacenado en la biblioteca de espectros a la CE seleccionada. Posteriormente dichos espectros fueron utilizados para la comparación con los espectros obtenidos de las muestras reales o fortificadas.

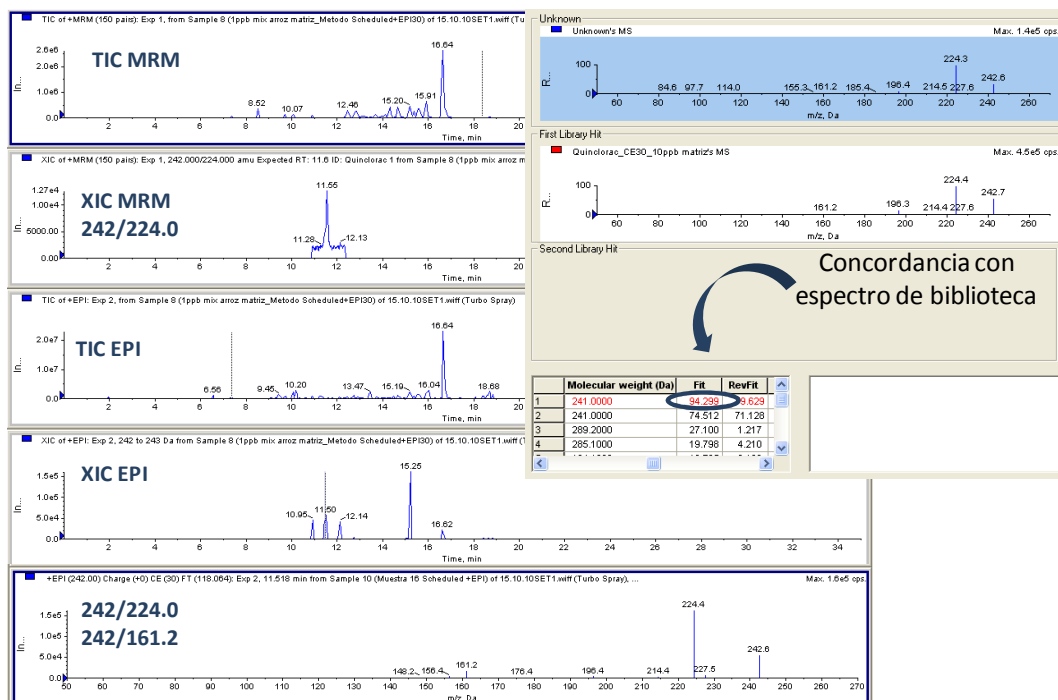


Figura 48. Cromatograma en modo IDA para el análisis de quinclorac en agua de arroz.

17.5.5. Método de análisis

17.5.5.1. Preparación de la muestra

El tratamiento de la muestra se esquematiza en la sección **12.4.6**. Cabe destacar que la adición de los 100 μL de ACN mejora la eficiencia del proceso de filtración, evitando que alguno de los analitos permanezcan retenidos en el filtro, a su vez el agregado de ACN diluye la muestra, disminuyendo aún más las posibles interferencias presentes en esta matriz.^(274,275,276) Tomando en cuenta las metodologías desarrolladas previamente para el análisis de agua, en las que el pH era un factor importante, se evaluó también en este caso el efecto del pH durante el análisis de los pesticidas en cuestión. Para esto se ajustó el

pH a diferentes soluciones en agua de arroz, conteniendo el mix de los pesticidas del estudio. Se trabajó a 4 pH diferentes; 3, 5, 7 y 8 y se compararon las diferencias en cuanto a la intensidad de cada pesticida a los diferentes pH. En general no se observaron diferencias significativas para la mayoría de los pesticidas. Las respuestas obtenidas (intensidad) para los pesticidas en estudio a los diferentes pH fue del mismo orden de magnitud excepto para algunos pesticidas como el malatión, temefós, propoxur, propafos y metsulfurón-metil en donde las diferencias en la intensidad fueron de aproximadamente el 20% entre medio ácido (pH 3) y medio básico (pH 8), por lo que el método fue validado a pH 3.⁽²⁵⁹⁾

17.5.6. Selección del modo de trabajo: Modo Estándar y modo Scheduled

Se compararon dos modos de trabajo o algoritmos diferentes; el modo Estándar y el modo Scheduled MRM™ (Scheduled) con el objetivo de evaluar sus capacidades y limitaciones. La evaluación de este tipo de algoritmos se debe realizar en términos de límites de detección y capacidad de identificación ya que la diferencia principal entre ellos será la sensibilidad.⁽²⁷⁷⁾ Una de las principales diferencias entre un modo y otro es que en el modo Estándar el dwell time (tiempo en el cual el equipo adquiere una transición (SRM) específica en cada ciclo) es generalmente optimizado cuando se diseña el método cromatográfico. En el caso del método diseñado en modo Estándar los dwell time para el modo positivo y negativo fueron de 5 y 100 msec, respectivamente. Mientras que el modo Scheduled, no es necesario fijar un dwell time. Este modo monitorea cada una de las transiciones (SRM) sólo cuando es necesario y no continuamente a lo largo del análisis. En este caso el tiempo de retención debe ser ajustado de manera precisa durante el diseño del método, de modo que el software conozca exactamente a qué tiempo debe monitorear cada una de las SRM.^(277,278) De esta forma se espera que la sensibilidad para cada uno de los compuestos monitoreados sea mayor. Con el fin de seleccionar el mejor modo de trabajo se compararon los LODs y el número de puntos con los cuales se construye cada pico cromatográfico.

17.5.6.1. LOD y LOQ

Uno de los parámetros evaluados para la selección del modo de trabajo fue el LOD de los pesticidas. Para esto se prepararon soluciones a determinadas concentraciones de los pesticidas en solvente y en matriz.

Este parámetro se determinó según lo definido en la sección **10.7.5**.

Como se observa en la **Figura 49** el modo Scheduled presentó un mejor desempeño ya que 67 compuestos presentaron una $S/N \geq$ que 3 a 0,1 $\mu\text{g/L}$ mientras que el modo Estándar solo 41 pesticidas cumplieron este criterio.

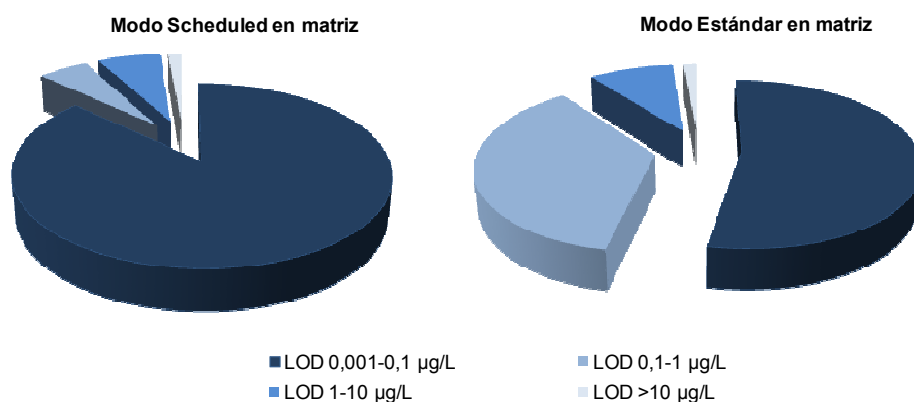


Figura 49. Comparación de los LOD obtenidos en agua de cultivos de arroz, mediante el modo Scheduled y el Estándar.

La **Figura 50** muestra el cromatograma de iones totales (TIC) para el carbendazím, para este fungicida en particular el modo Scheduled permite su identificación y cuantificación, ya que la S/N de ambas transiciones, (confirmación y cuantificación) son mayores que 3 y 10 respectivamente, mientras que el modo estándar la SRM2 no se observa y por lo tanto, a esta concentración no se puede identificar este analito.

En general los valores de LOQ obtenidos en modo Scheduled se encontraron en el rango desde 2 hasta 150 ng/L .

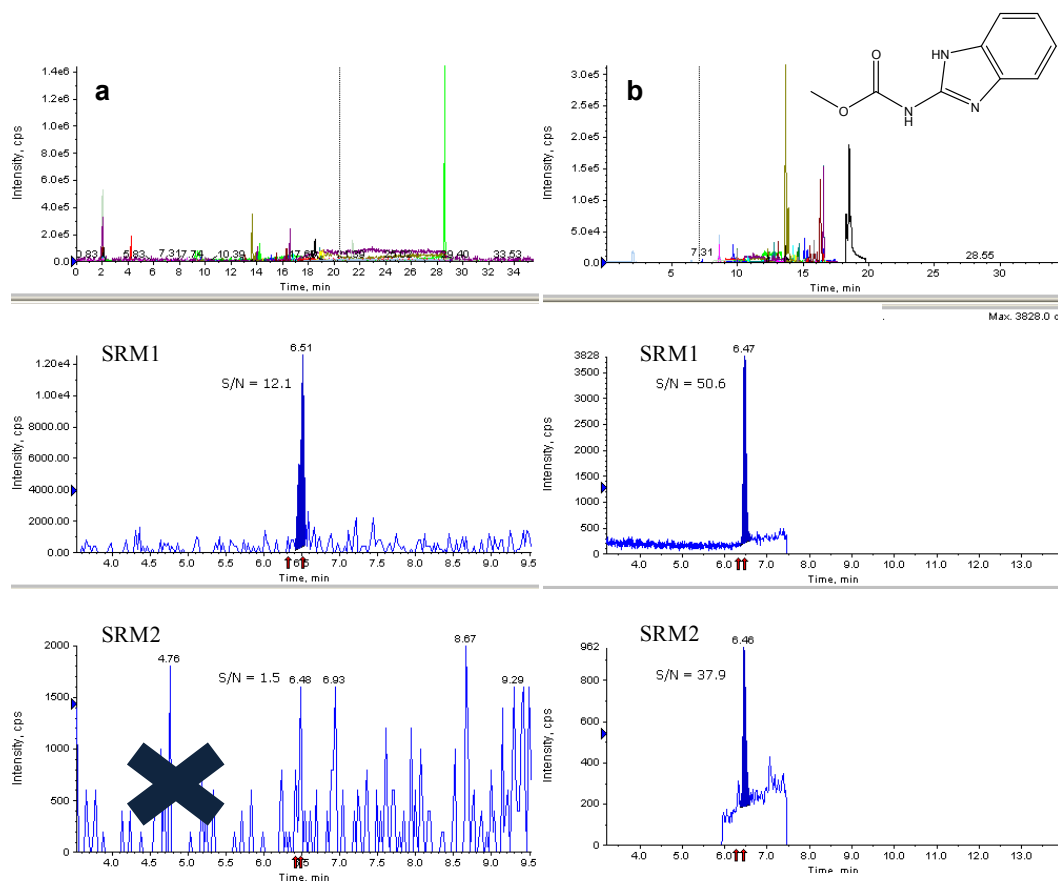


Figura 50. Cromatograma de iones totales y los cromatogramas de iones extraídos del carbendazim en modo Estándar (a) y Scheduled (b).

En particular para el quinclorac el LOD obtenido en el experimento IDA fue 0,05 µg/L calculado como la mínima concentración que reconoce la librería con una concordancia del 70%.

17.5.6.2. Número de puntos usados para el pico cromatográfico

Otro criterio de comparación para la selección del modo de trabajo fue el número de puntos generados para la construcción de cada uno de los picos cromatográficos. Según la literatura un pico está correctamente construido cuando está formado por 13-20 puntos.⁽¹⁷⁾ En este caso, las diferencias entre ambos métodos no fueron tan pronunciadas como en el caso de los LODs, sin embargo el modo Scheduled presentó en general un mayor número de puntos

(10-27) que el modo Estándar (7-14). En la **Tabla 35** se encuentran ejemplos de algunos de los pesticidas estudiados.

Pesticida	Nº puntos / Pico Modo Estándar	Nº puntos / Pico Modo Scheduled
Bensulfurón-metil	11	12
Diazinón	9	14
Edifenfos	9	12
Isoproturón	8	15
Malatión	8	13
Picoxistrobín	8	14
Tebuconazol	9	15
Teflubenzurón	10	11
Tiacloprid	10	15
Triciclazol	9	17

Tabla 35. Número de puntos por pico obtenidos en un extracto de agua de cultivo de arroz a 0,5 µ/L en modo Estándar y Scheduled.

A partir de estos resultados se decidió trabajar en modo Scheduled porque presenta mayor sensibilidad.

Con este método, de los 78 pesticidas seleccionados originalmente, 7 compuestos, bendiocarb, cihalofop-butil, 3,4-dicloroanilina, epoxiconazol, hexaconazol, iprodiona y molinato, presentaron LODs en el rango 0,5 hasta 5 µg/L, y el pirimifós-metil presentó problemas de linealidad por lo que finalmente se validó el método de análisis para 70 pesticidas (**Tabla 36**).

Resultados y Discusión

Pesticida	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Reproducibilidad (% RSD)		Repetitividad (% RSD)		r ²	pte matriz/pte solvente	SRM2/SRM1 (%RSD)
			1 (µg/L)	50 (µg/L)	1 (µg/L)	50 (µg/L)			
Azimsulfurón	0,04	0,045	11	10	7	5	0,9978	1,11	30 (16)
Azoxistrobín	0,0004	0,003	10	12	8	5	0,9941	1,07	43 (9)
Bensulfurón-metil	0,003	0,006	10	3	9	14	0,9907	0,93	59 (6)
Bentazone	0,008	0,03	17	17	12	10	0,9974	0,70	61 (6)
Bispiribac sodio	0,06	0,060	18	16	8	8	0,9965	1,16	17 (18)
Carbaril	0,03	0,050	16	12	6	6	0,9916	0,58	52 (7)
Carbendazím	0,009	0,009	18	13	5	2	0,9950	0,94	21 (4)
Carbofurán	0,002	0,004	17	15	6	5	0,9940	0,84	92 (4)
Clorotolurón	0,07	0,075	12	11	7	5	0,9962	0,93	4 (6)
Clomazone	0,5	0,5000	18	15	12	3	0,9911	0,89	1 (6)
Ciproconazol	0,004	0,011	16	13	6	4	0,9922	1,00	51 (7)
Diazinón	0,001	0,002	11	3	2	3	0,9994	0,24	66 (10)
Dietofencarb	0,008	0,026	12	12	4	4	0,9949	0,89	84 (9)
Difenoconazol	0,006	0,010	17	10	1	4	0,9954	0,89	45 (5)
Difenoaxurón	0,001	0,002	18	17	8	5	0,9940	1,01	64 (9)
Diflubenzurón	0,02	0,032	13	12	11	6	0,9987	0,82	78 (12)
Dimetoato	0,008	0,008	17	15	4	3	0,9969	0,94	50 (4)
Diurón	0,01	0,015	14	11	6	7	0,9967	0,95	9 (4)
Edifenfos	0,005	0,011	17	10	7	5	0,9974	0,74	41 (8)
Etiofencarb	0,002	0,007	11	11	6	4	0,9980	0,83	37 (11)
Fenobucarb	0,02	0,066	15	12	5	6	0,9972	0,90	57 (7)
Fenurón	0,03	0,030	13	10	6	2	0,9928	0,94	5 (6)
Fipronil	0,05	0,2	10	12	8	7	0,9947	0,95	10 (10)
Flufenoxurón	0,06	0,07	13	5	5	5	0,9938	0,70	23 (4)
Fluroxipir	0,02	0,04	18	15	4	5	0,9916	0,93	30 (5)
Flutolanil	0,004	0,005	10	9	12	6	0,9975	0,87	82 (11)
Imazapic	0,01	0,090	8	2	4	3	0,9968	1,10	81 (8)

Resultados y Discusión

Imazapir	0,007	0,017	16	12	4	3	0,9978	1,12	35 (4)
Imazaquín	0,005	0,005	9	9	13	6	0,9951	1,26	40 (11)
Imazetabenz-metil	0,01	0,013	19	17	6	8	0,9901	0,94	18 (12)
Imazosulfurón	0,01	0,012	14	12	7	7	0,9973	0,86	24 (10)
Imidacloprid	0,003	0,004	17	15	2	5	0,9959	1,10	72 (9)
Isoprocarb	0,03	0,032	14	14	4	9	0,9958	0,95	39 (9)
Isoproturón	0,06	0,060	16	15	6	4	0,9912	0,91	29 (12)
Kresoxim-metil	0,03	0,035	8	9	4	7	0,9973	0,92	94 (9)
Malatión	0,01	0,014	10	8	5	0,8	0,9945	0,95	96 (10)
Metsulfurón-metil	0,003	0,003	18	14	4	3	0,9941	1,00	16 (8)
Oxidemetón-metil	0,001	0,003	3	5	3	0,9	0,9954	0,91	33 (2)
Picoxistrobín	0,001	0,001	19	14	5	5	0,9951	1,00	79 (9)
Pirimicarb	0,001	0,001	16	5	2	2	0,9979	0,91	65 (11)
Procloraz	0,04	0,055	6	9	7	8	0,9941	1,04	10 (5)
Promecarb	0,04	0,05	10	14	4	7	0,9935	0,92	68 (8)
Propanil	0,08	0,08	10	13	12	10	0,9990	0,87	4 (12)
Propafos	0,003	0,005	18	14	7	6	0,998	0,92	32 (8)
Propaquizafop	0,03	0,03	12	10	6	0,6	0,9978	0,26	39 (4)
Propiconazol	0,04	0,04	10	11	6	3	0,9924	0,91	9 (8)
Propoxur	0,006	0,01	12	15	5	6	0,9973	0,82	75 (5)
Piraclostrobín	0,003	0,004	10	12	4	0,8	0,9986	0,67	32 (6)
Pirazosulfurón-etil	0,03	0,005	15	7	6	11	0,9994	0,85	16 (11)
Piridafentión	0,001	0,002	15	6	5	4	0,9974	0,95	50 (10)
Quinclorac	0,05	0,15	12	10	9	6	0,9985	1,03	--
Quinoxifen	0,02	0,02	18	4	2	1	0,9980	0,83	60 (3)
Spiroxamina	0,02	0,04	17	3	4	3	0,9994	0,92	48 (7)
Tebuconazol	0,002	0,005	11	7	3	3	0,9982	0,97	16 (14)
Tebufenozide	0,001	0,002	14	9	8	4	0,9977	0,87	10 (9)
Teflubenzurón	0,01	0,03	14	13	7	9	0,9971	0,18	40 (12)
Temefós	0,03	0,03	12	13	3	4	0,9915	0,76	60 (13)
Tetraconazol	0,02	0,008	4	8	3	6	0,9978	1,03	36 (14)

Resultados y Discusión

Tiacloprid	0,002	0,001	16	14	2	2	0,9934	0,93	15 (9)
Tiametoxam	0,03	0,03	4	4	3	2	0,9964	0,98	12 (3)
Tiodicarb	0,01	0,15	16	13	5	8	0,9968	0,80	15 (12)
Tiofanato etil	0,008	0,02	16	10	13	9	0,9981	0,87	90 (9)
Triadimefón	0,02	0,02	13	10	9	12	0,9952	0,89	10 (11)
Triadimenol	0,03	0,03	15	11	4	3	0,9905	0,91	10 (16)
Triazofós	0,001	0,003	14	11	5	5	0,9954	0,89	10 (10)
Triciclazol	0,001	0,002	15	14	4	4	0,9961	0,90	93 (6)
Trifloxistrobín	0,001	0,003	14	12	7	7	0,9985	0,96	52 (6)
Triflumizol	0,04	0,04	19	19	7	6	0,9987	0,90	36 (9)
Triflumurón	0,5	0,50	16	14	6	6	0,9985	0,86	50 (10)
2,4 D	0,01	0,08	7	9	10	8	0,9997	0,91	67 (16)

Tabla 36. Parámetros de validación: LOD, LOQ, reproducibilidad, repetitividad, coeficiente de correlación (r^2), pendiente matriz/solvente y SRM2/SRM1 obtenidos con el método desarrollado en modo Scheduled. En negrita: pesticidas analizados en modo ESI negativo.

17.5.7. Validación de la metodología

En este experimento, por las características de análisis, no se evaluó el % Rec., debido a que no hay una etapa de extracción y clean-up por lo que no deberían existir pérdidas de los analitos durante el tratamiento de la muestra. Esto constituye una ventaja ya que facilita el proceso de validación del método, disminuyendo el tiempo de análisis.

17.5.7.1. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

Como se muestra en la **Tabla 36**, la repetitividad, evaluada a 0,1 y 50 µg/L fue entre 1-13% mientras que la reproducibilidad evaluada en los mismos niveles de concentración durante 5 días consecutivos fue menor que 20%.

17.5.7.2. Linealidad

En general el comportamiento de los pesticidas en el rango 0,1 a 50 µg/L fue lineal en solvente y en matriz, con r^2 mayores a 0,99 como se observa en la **Tabla 36**. El diazinón presentó un comportamiento lineal en el rango de 0,1 a 25 µg/L.

17.5.7.3. Efecto Matriz

Como se comentó anteriormente el efecto matriz, ya sea aumento o supresión de la señal, en muestras complejas puede generar errores en la cuantificación de los analitos especialmente cuando estos se encuentran a concentraciones bajas. En este experimento no existe pre-concentración de la matriz, por lo que en principio era de esperar un efecto matriz despreciable. Como se muestra en la **Tabla 36**, a partir de la relación pendiente matriz/pendiente solvente, el 87% de los pesticidas en estudio no presentaron un efecto matriz relevante, mientras que el 10% de los pesticidas; bentazone, carbaril, diazinón, edifenfos, flufenoxurón, propaquizafop, piraclostrobín y teflubenzurón mostraron supresión de la señal media a alta. Imazaquín y propoxur fueron los únicos

compuestos en donde se observó un aumento de la señal (**Figura 51**). De los pocos pesticidas que presentaron EM mediante este método, al ser comparados con el EM obtenido durante la determinación de pesticidas en agua de cultivos de arroz mediante LC-QqQ/MS se pudo observar que prácticamente no existen concordancias. A partir de estos resultados se desprende que en las condiciones utilizadas para ambos métodos, el EM depende principalmente de las características del sistema de ionización y del método de extracción y clean-up, que son las únicas dos diferencias entre ambos métodos.

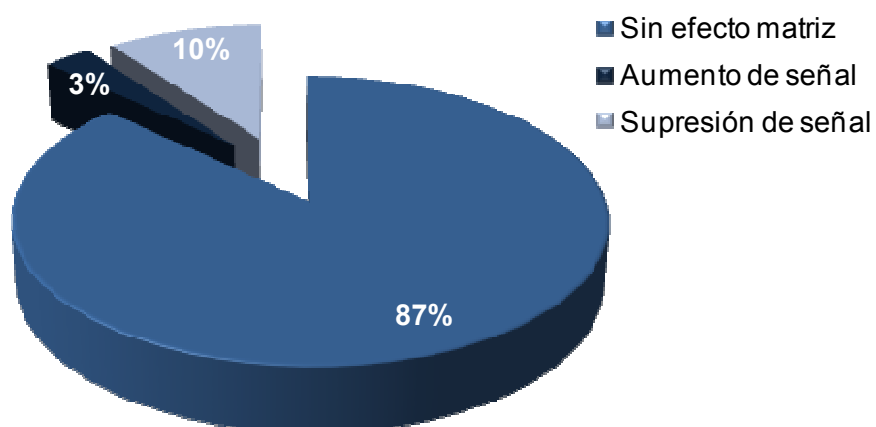


Figura 51. Efecto matriz expresado en % de pesticidas.

Los resultados del EM obtenido con esta metodología muestran la baja proporción de analitos afectados por la matriz, demostrándose la ventaja de trabajar con equipos de alta sensibilidad que permitan el análisis de muestras sin pre-concentración previa. Basados en estos resultados la cuantificación puede ser realizada a partir de curvas de calibración en solvente para 61 de los pesticidas estudiados, evitando el uso de curvas de calibración en matriz y por lo tanto reduciendo la incertidumbre de los resultados y simplificando el análisis.

17.5.7.4. Especificidad

En este experimento se calculó la relación SRM2/SRM1 para cada uno de los pesticidas en estudio en matriz para los diferentes puntos de la curva de calibración (0,1-50 µg/L) y se calculó el promedio de estos con su respectiva RSD (**Tabla 36**). La tolerancia máxima permitida en caso de que existan diferencias entre estas relaciones varía según las intensidades relativas entre 20 a 50%.^(233,272) Además se tomaron en cuenta los otros criterios establecidos por estas guías, la presencia de ambas transiciones al mismo tiempo de retención y la coincidencia del t_R de estas transiciones con las de un estándar. En la **Figura 52** se muestran el TIC y el XIC para una muestra de agua de arroz real en donde se detectó el triciclazol y una solución del estándar de triciclazol en donde se representan los 3 criterios utilizados en su identificación.

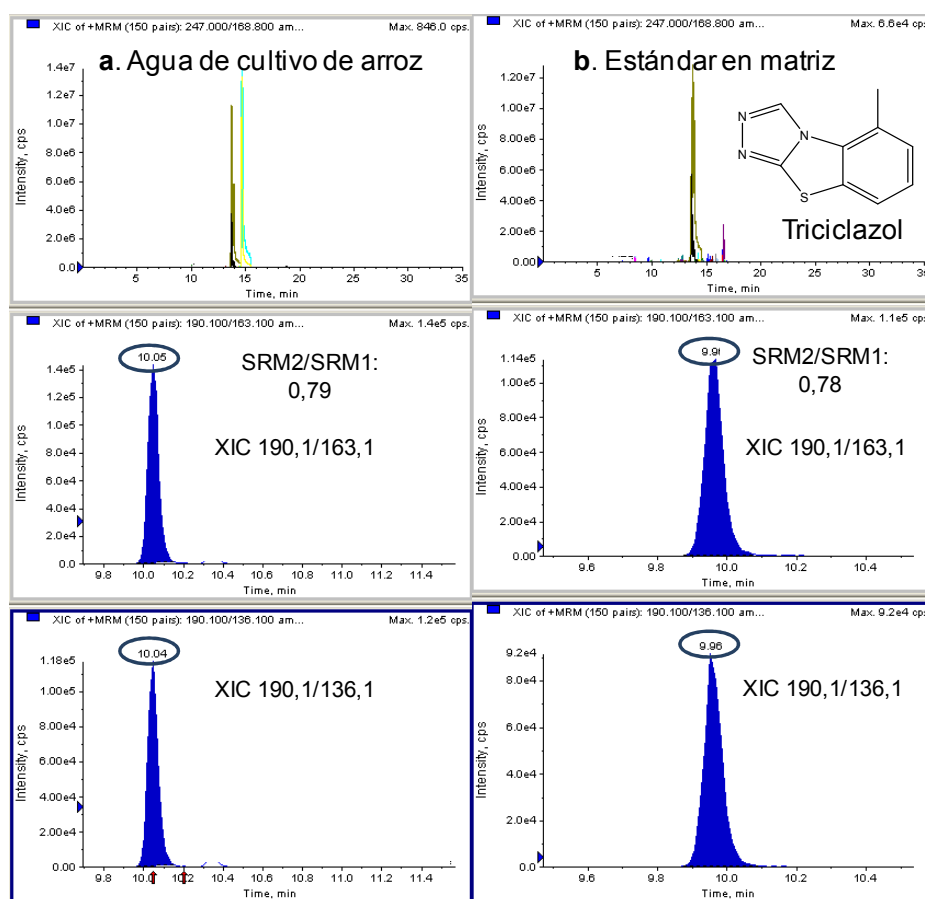


Figura 52. Criterios utilizados para la identificación y confirmación del triciclazol en agua de cultivo de arroz (a) y comparación con su estándar en matriz (b).

17.5.7.5. Análisis de muestras reales

El método propuesto fue utilizado para el análisis de 59 muestras de agua recolectadas en cultivos de arroz en diferentes regiones, 33 fueron de origen español y 26 de Uruguay.

En la **Figura 53** se presentan los principales resultados encontrados. En 31 de las 59 muestras analizadas se detectó al menos un pesticida. 10 muestras presentaron 3 pesticidas, otras 9 contenían 2 pesticidas mientras que en las 12 restantes se encontró un solo pesticida.

El compuesto más frecuentemente encontrado en las muestras de Uruguay fue el tebuconazol, seguido por el quinclorac que se detectó en algunas muestras pero en muy alta concentración. Fueron encontrados también residuos de carbendazím e imidacloprid, que en principio no son utilizados para cultivos de arroz. Particularmente el carbendazím está prohibido en nuestro país desde el 2009. Una posible explicación de la presencia de estos pesticidas en las muestras analizadas, es que el muestreo fue realizado en canales en los cuales drena también el agua de riego de cultivos de soja y estos 2 pesticidas son utilizados en el paquete que se aplica en este cultivo. En las muestras procedentes de España fueron encontrados 3 pesticidas; tebuconazol, triclozazol y bensulfurón-metil estos compuestos son ampliamente utilizados en cultivos de arroz en España y además, en su legislación, están aceptados para su uso.⁽²⁶⁾ Sin embargo, tomando en cuenta las concentraciones máximas admitidas por la UE para pesticidas en agua subterránea y potable (0,1 µg/L para cada pesticida individual y 0,5 µg/L para la suma de los pesticidas y sus metabolitos encontrados), la concentración detectada fue hasta 70 veces mayor. Estas altas concentraciones podrían constituir un potencial riesgo al medioambiente.^{(65,69,71),}

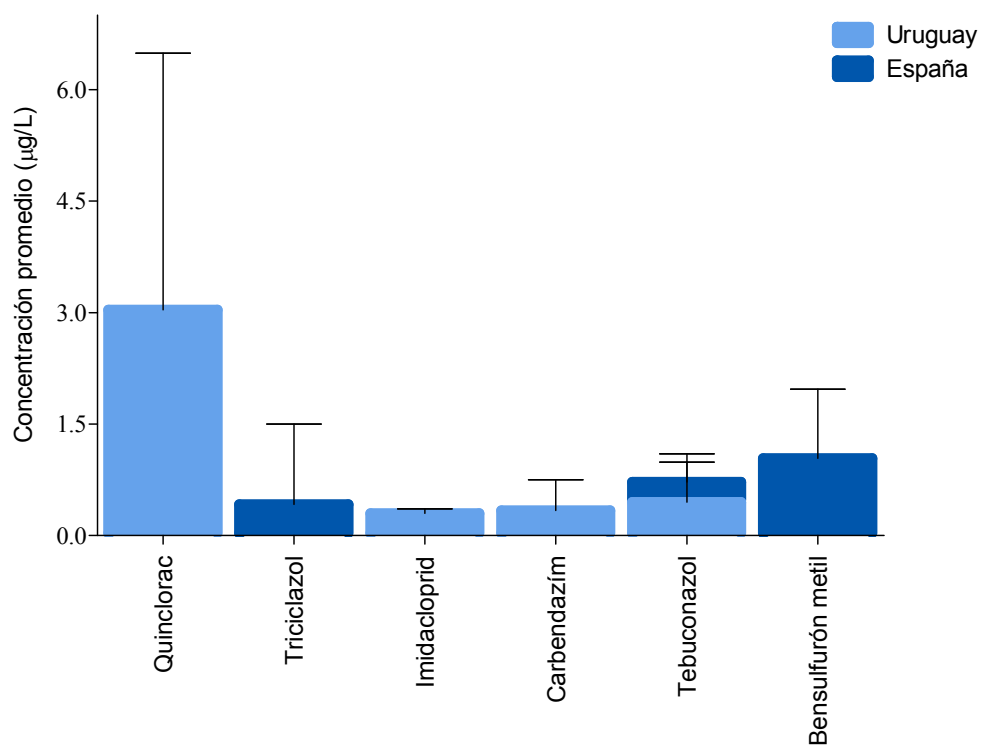


Figura 53. Concentración promedio de los pesticidas detectados en muestras de aguas de cultivos de arroz de Uruguay y España. Las barras indican la concentración máxima encontrada.

17.6. Conclusiones parciales del método desarrollado mediante LC-QLIT/MS

-Se diseñó un método rápido y eficiente para la determinación multi-residuo de 70 pesticidas en agua de cultivos de arroz utilizando LC-QLIT/MS sin etapa de extracción y clean up.

-Se evaluaron dos algoritmos del software, para la determinación de los compuestos de interés siendo el algoritmo Scheduled el que presentó mayor sensibilidad.

-Como no existe pre-concentración, e inclusive hay una dilución de la muestra previo a su inyección, más del 80 % de los analitos evaluados no presentan EM. Esto constituye una gran ventaja en términos de costo y tiempo porque se evita la preparación de curvas de calibración en matriz, pudiéndose realizar la cuantificación a partir de curvas de calibración en solvente.

-La comparación del EM observado mediante esta metodología de “dilute and shoot” y la metodología de SPE sugiere que el EM depende principalmente de las características del sistema de ionización y del método de extracción y clean up.

-El análisis de muestras reales mostró la presencia de tebuconazol, bensulfurón metil, quinclorac, carbendazím e imidacloprid, que coincide con los diferentes paquetes tecnológicos utilizados en cada país.

-Este sistema instrumental si bien no esta tan expandido como el de QqQ es una poderosa herramienta pensando en un laboratorio ambiental, por la posibilidad de alcanzar LOD muy bajos, del orden de los ng/L. Además el método desarrollado al no necesitar de etapas de pre-concentración permite evaluar un número muy grande de muestras lo que lo convierte en una herramienta muy útil para el análisis de rutina.

Arroz

18. Análisis de pesticidas en arroz

18.1. Justificación y objetivos

Debido a las peculiaridades del sistema de producción de arroz, que involucra un gran uso de pesticidas, principalmente herbicidas, puede ocurrir contaminación quedando sus residuos en el grano de arroz. Esto hace necesario desarrollar métodos analíticos que permitan analizar estos residuos de pesticidas no solo en el suelo y el agua para evaluar el impacto del uso de estos compuestos en el ambiente sino también en el grano para asegurar la inocuidad de dicho alimento.

En este trabajo se desarrolló un método para el análisis de los herbicidas de post-emergencia antes mencionados en arroz blanco mediante LC-DAD. Posteriormente se amplió el método para el análisis de pesticidas en arroz blanco y arroz paddy mediante LC-MS/MS.

18.2. Desarrollo de metodología para análisis de herbicidas en arroz mediante LC-DAD

La selección de los herbicidas y la optimización de los parámetros cromatográficos se discutió en la sección **16.2**. En la **Figura 54** se muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra de arroz envenenada a una concentración de 0,25 mg/kg de los analitos de interés en las condiciones cromatográficas descritas en la sección **10.5.1**.

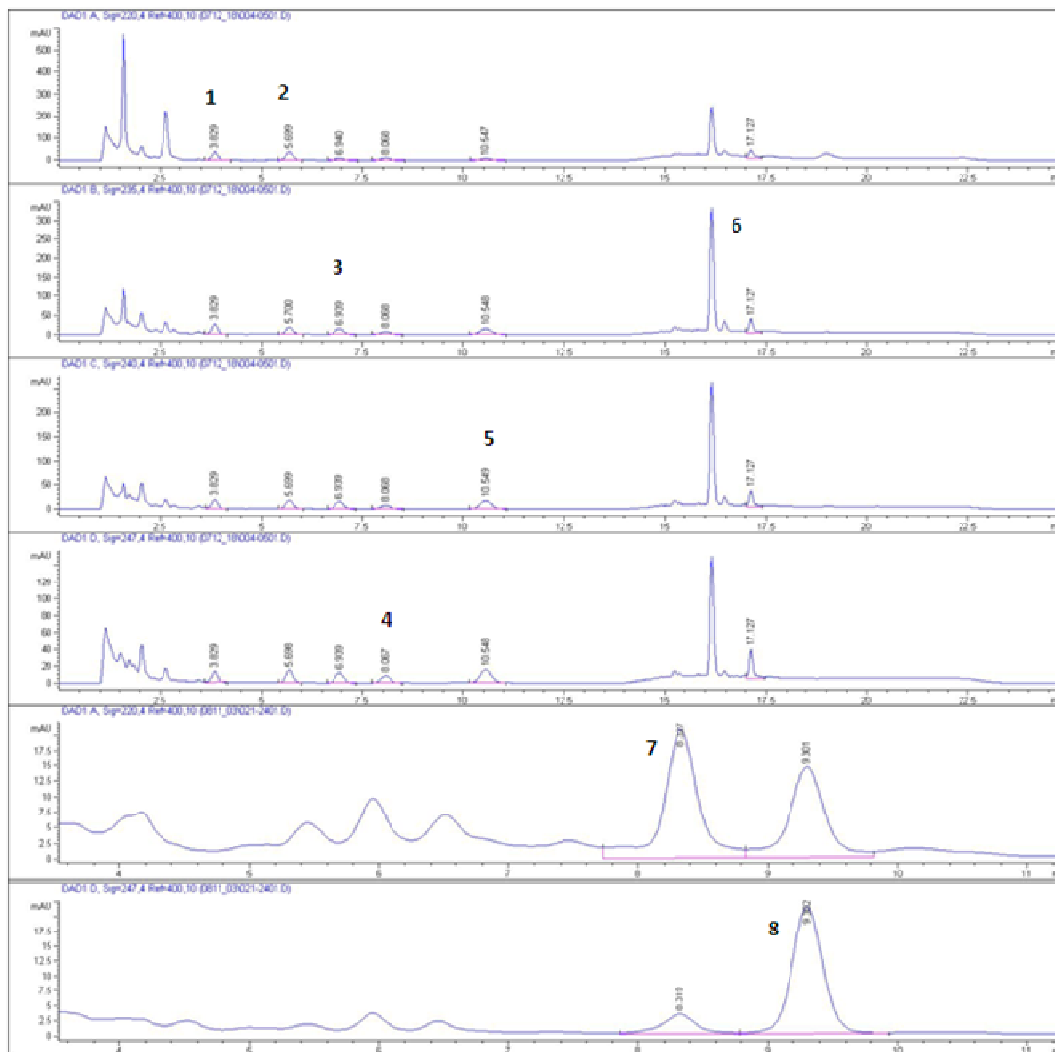


Figura 54. Cromatograma de un extracto de arroz a 0,25 mg/kg; (1) metsulfurón-metil; (2) bentazone; (3) bensulfurón-metil; (4) bispiribac sodio; (5) pirazosulfurón-etil; (6) cihalofop-butil (7) clomazone; (8) propanil. Cada herbicida está señalado a su respectiva longitud de onda.

18.2.1. Validación de la metodología

18.2.1.1. Métodos de extracción y clean-up

En los últimos años una de las metodologías de elección para el análisis multi-residuo de pesticidas en alimentos es el método de QuEChERS. En su versión original, esta metodología consiste en la extracción con ACN y un posterior clean-up dispersivo. QuEChERS tiene la ventaja de que permite la variación de las condiciones de extracción y clean-up según la matriz y los pesticidas en estudio. Por este motivo, dada la complejidad de la matriz arroz, se seleccionó

esta metodología para comenzar el desarrollo de un método de análisis. Para lograr una buena extracción de las muestras con baja humedad QuEChERS recomienda la adición de agua, por lo que en este caso el arroz fue molido y se adicionó agua para formar una suspensión.⁽¹⁴⁹⁾ De esta forma se favorece la interacción de la muestra con el solvente, mejorando la extracción de los analitos de interés. Debido a la diferencia en polaridad de los herbicidas seleccionados para el análisis fueron evaluados diferentes solventes para su extracción; ACN y MeOH con y sin HAc. Además se testearon diferentes condiciones de extracción y clean-up de la muestra de arroz molido que se presentan en la **Tabla 37**. El paso de extracción en el método QuEChERS puede realizarse con diferentes sales según los compuestos a analizar de forma de ajustar el pH para favorecer la extracción de ciertos compuestos con características físico-químicas determinadas. En este experimento se testeó el uso de HAc y acetato de sodio como medio buffer, reportado como QuEChERS acetato.

Condiciones de extracción	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5 (QuEChERS modificado)
Cantidad de muestra (g)	5	10	5	5	10
Cantidad de agua adicionada (mL)	-	-	5	5	10
Solvente	20 mL MeOH	20 mL MeOH	20 mL MeOH	20 mL 1% HAc en ACN	20 mL 1% HAc en ACN
Salting-out	-	1,9 g MgSO ₄	5 g MgSO ₄	5 g MgSO ₄	7 g MgSO ₄ + 1,8 g NaOAc·3H ₂ O
Método de agitación	Ultrasonido, 15 min	Ultrasonido, 15 min	Manual, 4 min	Manual, 4 min	Manual, 4 min
Clean-up	-	100 mg Carbón activado	-	-	-

Tabla 37. Condiciones experimentales optimizadas para los 5 métodos estudiados.

18.2.1.2. Estudio de Recuperación

El ensayo de recuperación se realizó con una muestra de arroz, fortificada a 3 niveles de concentración: 0,1; 0,25 y 0,5 mg/kg. Los mejores resultados se obtuvieron empleando una modificación del método de QuEChERS (método 5) en la cual la suspensión formada por el agua y el arroz molido, se extrae con 1% de HAc en ACN, MgSO₄ y acetato de sodio. La modificación con respecto al método QuEChERS acetato reportado consiste principalmente en que se evita el uso de PSA para el clean-up, dado las características ácidas de alguno de los herbicidas en estudio.^(148,154) La **Tabla 38** muestra una comparación de los % Rec. y los % RSD para las 3 de las 5 metodologías evaluadas a 1,5 mg/kg (método 3-5) que mostraron el mejor desempeño. Como se observa en la **Tabla 39**, el método 5, que fue el seleccionado para realizar la validación, presentó un % Rec. en el rango de 87 a 96%, y % RSD entre 1 y 4%, cumpliendo con los requerimientos de la DG SANCO.⁽²³³⁾ Este método fue luego aplicado con buenos resultados para el análisis de clomazone y propanil mientras que el quinclorac no pudo ser validado por presentar bajos % Rec., una posible explicación es que por su pKa, al pH del medio de extracción, presenta una baja solubilidad en el ACN y por lo tanto la eficiencia de extracción puede ser baja.

Herbicida	Método 3 % Rec. (% RSD)	Método 4 % Rec. (% RSD)	Método 5 % Rec. (% RSD)
Bensulfurón-metil	26 (-)	78 (0,3)	91 (1)
Bentazone	17 (-)	81 (3)	87 (4)
Bispiribac sodio	11 (-)	83 (4)	96 (1)
Cihalofop-butil	58 (-)	77 (1)	92 (4)
Metsulfurón-metil	13 (-)	80 (4)	89 (2)
Pirazosulfurón-etil	30 (-)	85 (2)	95 (1)

Tabla 38. Comparación de los % Rec. y % RSD para 3 de los métodos testeados, (n=5).

Herbicida	Método 5		
	0,10 mg/kg % Rec. (% RSD)	0,25 mg/kg % Rec. (% RSD)	0,50 mg/kg % Rec. (% RSD)
Bensulfurón-metil	66 (10)	87 (1)	75 (0,3)
Bentazone	48 (6)	73 (4)	70 (11)
Bispiribac sodio	52 (12)	85 (5)	69 (4)
Cihalofof-butyl	78 (3)	80 (0,4)	81 (3)
Metsulfurón-metil	55(5)	75 (7)	73 (1)
Pirazosulfurón-etil	60 (11)	77 (1)	73 (2)
Clomazone	111 (12)	79 (1)	75 (2)
Propanil	84 (11)	69 (1)	65 (1)
Quinclorac	N.D. (-)	N.D. (-)	10 (11)

Tabla 39. % de Rec. y % RSD obtenidos durante la validación del método 5, (n=5). N.D.; No Detectado.

18.2.1.3. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

La repetitividad del método 5 fue menor que 12% para los tres niveles de fortificación estudiados. Mientras que la reproducibilidad, evaluada a partir del análisis con 3 operarios diferentes, demostró que no existen diferencias significativas en los resultados.

18.2.1.4. LOD y LOQ

Dado que el Reglamento Bromatológico Nacional adopta los LMR del *Codex Alimentarius* y éste no establece límites para estos herbicidas, se podría decir que los resultados presentados en la **Tabla 40**, cumplen con la legislación de nuestro país.^(76,108) Sin embargo los LOQ son demasiado altos comparados con los LMR fijados por la UE para arroz blanco por lo que se debería utilizar una técnica instrumental más sensible para alcanzar LOQ más bajos.^(26,279)

18.2.1.5. Linealidad

Todos los herbicidas mostraron comportamiento lineal, en el rango de 0,25-10 mg/kg, con r^2 mayores a 0,998 como se muestra en la **Tabla 40**.

	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Ecuación de calibración	r ²
Bensulfurón-metil	0,08	0,25	y = 53,387x – 2,6649	0,9973
Bentazone	0,08	0,25	y = 101,4x – 3,1521	0,9985
Bispiribac sodio	0,08	0,25	y = 26,309x + 4,5988	0,9924
Cihalofop-butil	0,03	0,10	y = 43,646x – 4,3396	0,9991
Metsulfurón-metil	0,08	0,25	y = 81,128x + 3,4755	0,9994
Pirazosulfurón-etil	0,08	0,25	y = 65,457x + 2,8877	0,9967
Clomazone	0,03	0,10	y = 81,822x - 2,714	0,9978
Propanil	0,03	0,10	y = 110,5x - 7,7573	0,9978

Tabla 40. Límites de detección, cuantificación y linealidad de los diferentes herbicidas obtenidos durante la validación del método 5, QuEChERS modificado.

18.2.1.6. Análisis de muestras reales

Se analizaron 25 muestras de grano de arroz, en las que no se detectó presencia de residuos de los 9 herbicidas evaluados por encima del LOD del método 5.

18.2.2. Conclusiones parciales del método desarrollado mediante LC-DAD

-Se desarrolló una metodología para el análisis de herbicidas de post-emergencia en arroz blanco mediante LC-DAD.

-Esta técnica sirve como insumo para el control de los residuos de los 9 herbicidas seleccionados si se toma como referencia el LMR fijado por el Codex, tal como lo estipula el Reglamento Bromatológico Nacional.

-El análisis de las muestra reales indica que los herbicidas utilizados en nuestro país para el cultivo de arroz no permanecen en el grano de arroz luego de su procesamiento a los niveles de detección del método.

18.3. Validación de método de análisis de pesticidas en arroz blanco mediante LC-QqQ/MS

18.3.1. Selección de los pesticidas

La selección de los analitos fue la misma que para el método desarrollado para el análisis de aguas mediante LC-QqQ/MS. La **Figura 55** muestra los TICs en modo ESI positivo y negativo de un extracto de arroz blanco fortificado a 100 µg/kg obtenidos en las condiciones descritas en la sección **10.5.2**.

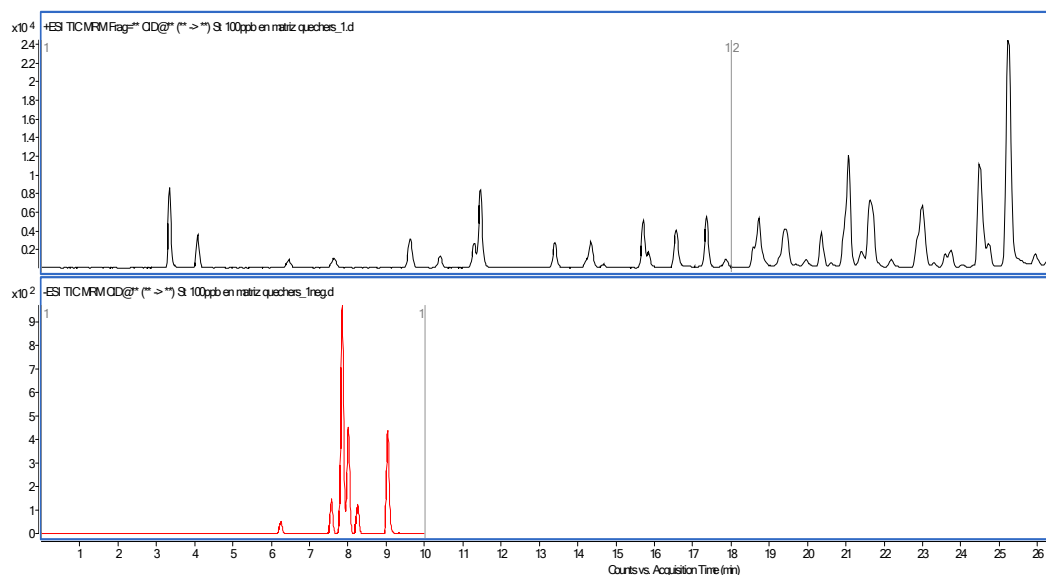


Figura 55. Cromatograma de iones totales (TIC) de un extracto de arroz blanco a 100 µg/kg obtenido con el método de QuEChERS original y analizado en las condiciones descritas en la sección **10.5.2**.

18.3.2. Validación de las metodologías en arroz blanco

La evaluación de las cifras de mérito se realizó para los 4 métodos presentados en la **Tabla 41**.

18.3.2.1. Selección de la cantidad de muestra

Según la literatura la cantidad de muestra utilizada para el análisis de residuos de pesticidas en cereales mediante el método QuEChERS varía entre 5-10 g. (114,116,146,148,157,231)

El arroz, por su composición química puede ser considerado una matriz compleja, donde una gran cantidad de componentes pueden ser co-extraídos durante el proceso de extracción y clean-up. En este trabajo se testaron 3 cantidades de muestra (5; 7,5 y 10 g) para determinar las condiciones óptimas de análisis de forma de llegar a un equilibrio entre la sensibilidad del método y el efecto matriz.

La **Figura 56** muestra la distribución promedio de los pesticidas (en porcentaje) para las 3 masas utilizadas con los 4 métodos estudiados.

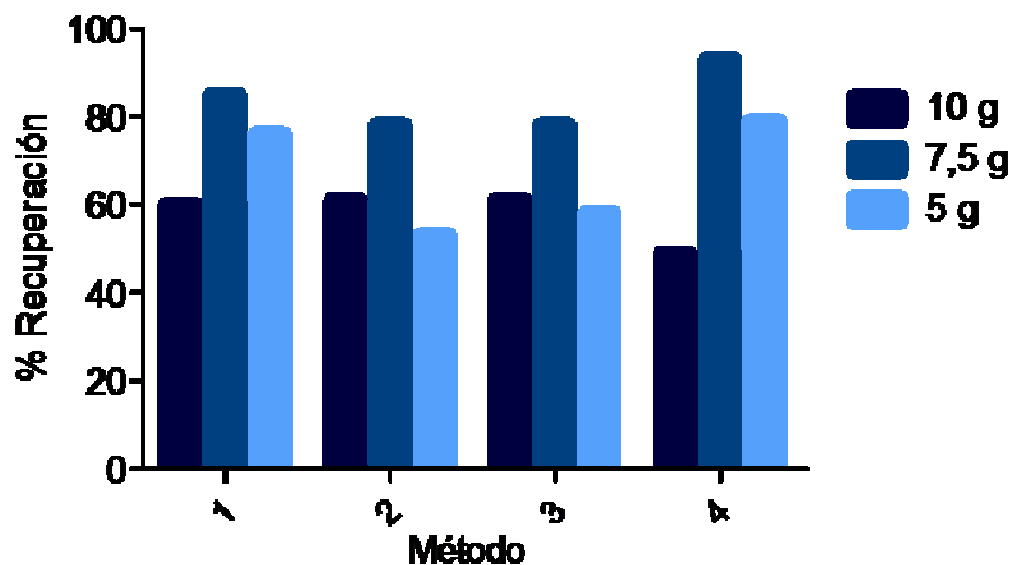


Figura 56. % Rec. promedio obtenido para cada una de las masas de muestra testeadas (5; 7,5 y 10 g) con los 4 métodos de extracción y clean-up evaluados.

Como se observa en el gráfico trabajando a partir de 7,5 g de muestra se obtienen en promedio, mejores resultados. Los % Rec. obtenidos a partir de la extracción de 5 g de muestra son en general menores, pero igualmente aceptables, para las 4 metodologías. Sin embargo para algunos pesticidas relevantes en cultivos de arroz, como el fungicida epoxiconazol en los métodos A3 y A4 y el propanil en los métodos A2 y A3 trabajando con 5 g de muestra los % Rec. no cumplen con los requerimientos de la DG SANCO.

Para 10 g de muestra las recuperaciones son menores que las obtenidas para 5 o 7,5 g y además como se explica en la sección **18.3.2.7**, la cantidad de componentes co-extraídos es mayor. Por esta razón la validación de los métodos se realizó a partir de 7,5 g de muestra ya que muestra el mejor compromiso entre los % Rec. y la cantidad de co-extractivos provenientes de la matriz.

18.3.2.2. Ensayos de Recuperación

18.3.2.3. Métodos de extracción y clean-up

Los estudios de recuperación se realizaron a partir de una muestra de arroz blanco en dos niveles de concentración 10 y 300 µg/kg, para los 4 métodos estudiados, basados en el método de QuEChERS; QuEChERS original (método A1), QuEChERS citrato con y sin clean-up (método A2 y A3) y QuEChERS acetato sin clean-up (método A4), para las 3 cantidades de muestra mencionadas. La **Tabla 42** muestra las principales diferencias en las condiciones de extracción de los métodos evaluados.

	Método A1 (AB y AP)	Método A2 (AB y AP)	Método A3 (AB)	Método A4 (AB)	Método A5 (AP)
Solvente	15 mL ACN	15 mL ACN	15 mL ACN	15 mL 1% HAc en ACN	15 mL 1% HAc en ACN
Salting-out	4 g MgSO ₄ 1 g NaCl	4 g MgSO ₄ 1 g NaCl 1 g citrato de sodio dihidratado 0,5 g sesquihidrato	4 g MgSO ₄ 1 g NaCl 1 g citrato de sodio dihidratado 0,5 g sesquihidrato	7 g MgSO ₄ 1,8 g NaOAc·3H ₂ O	7 g MgSO ₄ 1,8 g NaOAc·3H ₂ O
Clean-up	300 mg MgSO ₄ 100 mg PSA	750 mg MgSO ₄ 150 mg PSA 150 mg C-18	1 g MgSO ₄	1 g MgSO ₄	750 mg MgSO ₄ 250 mg PSA
pH del extracto final	8,4	8,0	4,1	6,3	-

Tabla 41. Condiciones experimentales para los 4 métodos estudiados. AB; arroz blanco, AP; arroz paddy.

En la **Tabla 42** se presentan los resultados obtenidos de % Rec. y % RSD para 7,5 g de muestra. El método A4 permite analizar 36 pesticidas satisfactoriamente. Otros 5 pesticidas; Imazapic, Imazaquín, Imazapir, iprodiona y quinclorac, presentaron dificultades con esta metodología, sin embargo se podrían analizar con alguno de los otros métodos evaluados. Los métodos A1, A2 y A3 presentaron buenos % Rec. y % RSDs para más de 30 pesticidas.

Los compuestos kresoxim metil y cihalofop butil presentaron % Rec buenos a 300 µg/kg, pero como se explica en la sección **18.3.2.5** de este experimento no pudieron ser analizados a 10 µg/kg por su elevado LOD.

Para el caso de las imidazolinonas (imazapic, imazapir, imazaquín, pKa ~ 1,9-3,8)⁽²⁸⁾, muy usados en cultivos de arroz, se esperaban mayores % Rec. en los métodos sin adición de PSA (métodos A3 y A4), debido a la capacidad del PSA de retener compuestos ácidos. Sin embargo esta teoría no se corroboró experimentalmente. En la **Tabla 42** se observa que las imidazolinonas presentaron buenas recuperaciones con el método A3 sin embargo, el método A4 no cumplió con los requerimientos de la DG SANCO. Por otro lado, como se presenta en la sección **18.3.2.7**, estos pesticidas no muestran efecto matriz y la relación S/N se encuentra en el rango 6-60, por lo que una posible explicación de la diferencia en los porcentajes de recuperación de ambos métodos puede ser el pH de extracción, dado que el pH del extracto final del método A3 es 4,1 y el del método A4 es 6,3.

Así mismo, el método A1, que incluye una etapa de clean-up con PSA, presenta mejores resultados para estos herbicidas que el método A2. Una posible explicación podría ser que la cantidad de PSA (100 mg) compitiendo con los componentes co-extraídos del arroz (ácidos grasos y otros ácidos orgánicos) es relativamente baja, mientras que en el método A2 la cantidad de PSA (150 mg) interaccionando con las funciones ácidas de los herbicidas es mayor, con la consiguiente disminución en los % Rec. Además estos herbicidas presentaron un efecto matriz importante, alrededor del 40% con el método A2, lo que también podría afectar la recuperación de dichos compuestos.

El quinclorac sólo presentó buenas recuperaciones con el método A3. En principio se esperaba que con los métodos en los cuales no se utilizó PSA para

el clean-up, método A3 y A4, se obtuvieran buenos resultados, pero solamente el método A3 dio buenos % Rec. para este herbicida. Una posible explicación es la diferencia en el pH del medio de extracción de ambos métodos. El pH del método A3 fue 4,1 mientras que el pH del método A4 fue 6,3. El quinclorac posee un pKa de 4,34, por lo que al pH del método A3 se encuentra principalmente en su forma neutra y por lo tanto se favorece la solubilidad en ACN. De todas formas, como fue discutido en el método desarrollado para aguas mediante LC-QqQ/MS, no fue posible confirmar este herbicida por no presentar las 2 transiciones necesarias para su correcto análisis.

En resumen, los métodos A1 y A4 presentaron el mejor desempeño para el análisis de los pesticidas seleccionados, excepto para los herbicidas imidazolinonas en donde el método A3 presentó los mejores resultados.

Resultados y Discusión

Pesticida	Método A1		Método A2		Método A3		Método A4	
	10 µg/kg	300 µg/kg	10 µg/kg	300 µg/kg	10 µg/kg	300 µg/kg	10 µg/kg	300 µg/kg
Azimsulfurón	87 (3)	102 (2)	109 (13)	77 (9)	109 (19)	95 (10)	103 (12)	91 (4)
Azoxistrobín	113 (6)	100 (2)	109 (14)	91 (4)	102 (13)	94 (7)	95 (4)	90 (1)
Bensulfurón-metil	83 (10)	102 (2)	97 (15)	76 (11)	113 (14)	95 (11)	106 (14)	85 (3)
Bentazone	86 (8)	99(1)	83 (5)	78 (4)	92 (6)	83 (6)	75 (7)	76 (3)
Bispiribac sodio	51 (37)	100 (6)	82 (22)	81 (20)	62 (14)	87 (6)	84 (27)	68 (3)
Bromacilo	108 (12)	99 (3)	111 (11)	94 (5)	113 (10)	97 (10)	96 (5)	88 (1)
Carbaril	107 (7)	103 (14)	115 (5)	97 (7)	95 (14)	99 (8)	108 (14)	90 (2)
Carbendazím	98 (7)	99 (3)	115 (8)	85 (4)	82 (8)	86 (10)	88 (4)	81 (1)
Carbofurán	129 (6)	96 (7)	128 (11)	94 (3)	99(17)	90 (10)	118 (12)	85 (3)
Clomazone	104 (5)	103 (7)	111 (11)	87 (6)	105 (11)	78 (14)	93 (7)	78 (6)
Cihalofop-butil	NA	92 (14)	NA	90 (14)	NA	84 (14)	NA	81 (11)
Diflubenzurón	119 (10)	105(6)	95 (8)	91 (6)	61 (24)	59 (5)	84 (13)	76 (7)
Dimetoato	103 (7)	98 (3)	97 (9)	89 (4)	106 (20)	91 (10)	86 (13)	86 (2)
Edifenfos	123 (6)	111 (8)	86 (16)	85 (6)	48 (24)	63 (8)	75 (15)	68 (4)
Epoxiconazol	101 (9)	101 (2)	102 (18)	86 (5)	67 (10)	66 (11)	74 (12)	71 (8)
Etiofencarb	103 (5)	99 (3)	98 (9)	90 (5)	93 (9)	89 (10)	88 (3)	79 (5)
Fluroxipir	99 (4)	100 (2)	38 (34)	29 (19)	118 (20)	77 (10)	78 (20)	48 (7)
Flutolanil	115 (9)	102 (2)	106 (10)	96 (3)	90 (10)	83 (7)	94 (4)	86 (1)
Imazapic	42 (11)	66 (8)	42 (11)	31 (14)	82 (13)	88 (3)	66 (8)	50 (2)
Imazapir	33 (22)	30 (7)	33 (22)	24 (14)	75 (12)	85 (3)	29 (7)	29 (5)
Imazaquín	43 (15)	60 (12)	43 (15)	34 (15)	80 (12)	79 (10)	60 (12)	58 (2)
Imazosulfurón	78 (14)	102 (2)	96 (16)	71 (13)	94 (10)	85 (11)	91 (18)	83 (5)
Imidacloprid	97 (8)	100 (1)	109 (6)	89 (8)	91 (12)	91 (11)	121 (5)	88 (3)
Iprodiona	90 (7)	98 (5)	99 (15)	84 (4)	73 (19)	81 (7)	66 (18)	69 (7)
Kresoxim-metil	NA	106 (5)	NA	83 (8)	NA	71 (6)	NA	75 (4)
Malatión	117 (5)	101 (6)	108 (15)	90 (2)	70 (5)	80 (7)	92 (4)	84 (2)
Metsulfurón-metil	70 (9)	100 (3)	88 (12)	70 (11)	115 (15)	91 (8)	101 (9)	85 (7)
Molinato	87 (17)	124 (18)	51 (16)	52 (4)	64 (5)	68 (5)	80 (20)	66 (20)
Oxidemetón-metil	106 (9)	101 (2)	109 (15)	89 (4)	95 (15)	99 (8)	90 (6)	87 (4)

Resultados y Discusión

Picoxistrobín	117 (5)	107 (2)	90 (16)	85 (5)	49 (9)	70 (7)	75 (4)	79 (3)
Propanil	101 (9)	101 (1)	89 (9)	95 (5)	77 (6)	82 (1,3)	86 (5)	84 (2)
Propiconazol	105 (3)	104 (2)	123 (7)	81 (9)	60 (28)	64 (11)	72 (12)	59 (4)
Pirazosulfurón-etil	114 (11)	102 (2)	107 (15)	78 (7)	94 (16)	91 (8)	95 (11)	86 (5)
Piridafentión	85 (8)	101 (3)	87 (13)	77 (13)	69 (7)	83 (12)	104 (12)	81 (4)
Quinclorac	56 (10)	42 (6)	56 (17)	41 (17)	96 (20)	71 (9)	32 (6)	56 (10)
Tebuconazol	118 (6)	102 (5)	102 (8)	79 (4)	60 (6)	67 (18)	91 (14)	69 (9)
Tebufenozide	88 (9)	106 (3)	98 (12)	92 (4)	54 (12)	74 (6)	76 (8)	78 (2)
Tiacloprid	113 (2)	101 (1)	123 (11)	92 (4)	91 (10)	92 (11)	121 (14)	90 (2)
Tiametoxam	102 (11)	99 (3)	118 (16)	88 (4)	102 (24)	91 (11)	97 (11)	90 (3)
Tiofanato-etil	119 (17)	118 (18)	58 (19)	84 (10)	104 (16)	103 (10)	105 (13)	111 (3)
Triadimefón	103 (18)	102(4)	89 (9)	85 (2)	75 (6)	74 (11)	83 (13)	80 (8)
Triadimenol	118 (8)	100 (4)	99 (8)	88 (4)	88 (12)	87 (8)	87 (10)	85 (4)
Triciclazol	101 (3)	102 (2)	111 (3)	88 (3)	112(8)	89 (10)	101 (3)	83 (2)

Tabla 42. % Rec. y % RSD obtenidos mediante LC-QqQ/MS para todos los pesticidas seleccionados en arroz blanco para los 4 métodos estudiados a 10 y 300 µg/kg usando 7,5 g de muestra, (n=5).

18.3.2.4. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

La repetitividad obtenida para los 4 métodos se presenta en la **Tabla 42**. En general fue menor a 20% para todos los pesticidas estudiados excepto para el bispiribac sodio que presentó valores mayores con los métodos A1, A2 y A4 a 10 µg/kg. Los % RSD obtenidos a 10 µg/kg fueron mayores que a 300 µg/kg. La reproducibilidad intra-laboratorio se evaluó a partir del análisis en diferentes días, y se observaron %RSD en el rango 10-22%.

18.3.2.5. LOD y LOQ

Los LODs se estimaron para los 4 métodos evaluados y fueron del mismo orden. De los 43 pesticidas en estudio 27 presentaron LODs en el rango de 2,5 a 5 µg/kg, 14 compuestos presentaron un LOD de 10 µg/kg. Para todos estos el valor más alto de LOQ observado fue 10 µg/kg y no se observaron diferencias entre los distintos métodos evaluados. Estos resultados cumplen con los niveles exigidos por la regulación europea (EC) No. 299/2008.⁽²⁷⁹⁾

Sólo cihalofof-butil y el kresoxim-metil presentaron LOD mayores a 50 µg/kg. El valor de LOD y LOQ del kresoxim metil fue 53 µg/kg. Mientras que el cihalofof butil pudo ser cuantificado solo a partir del nivel de 250 µg/kg. Estos altos LOD se pueden deber a una baja respuesta en las condiciones de electrospray seleccionadas, con las cuales no se obtuvo una señal de confirmación intensa.

18.3.2.6. Linealidad

La cuantificación de los analitos de interés fue realizada a partir de una curva de calibración en el rango 5-500 µg/kg en matriz para todos los 4 métodos del estudio. Todos los pesticidas presentaron una linealidad aceptable, con $r^2 \geq 0,998$.

18.3.2.7. Efecto Matriz

Dado la complejidad de la matriz, el efecto de esta se evaluó de forma cuantitativa y cualitativa utilizando LC-TOF/MS en full scan. El estudio cualitativo permite el análisis del perfil de los co-extractivos presentes en los diferentes extractos para cada uno de los métodos testeados.

Efecto matriz mediante LC-QqQ/MS

La mayoría de los pesticidas presentaron efecto matriz ya sea aumento o supresión de la señal, por lo que para evitar errores durante la cuantificación ésta se realizó a partir de la curva de calibración en matriz, de acuerdo a lo que estipula la DG SANCO.⁽²³³⁾

Como se muestra en la **Tabla 43** el método A3 mostró una supresión de la señal en el 90% de los compuestos estudiados. Mientras que el método A4 fue el que presentó mayor cantidad de pesticidas sin efecto matriz ($EM \leq \pm 25\%$). Con los métodos A1 y A2 se observa aumento y/o supresión de la señal dependiendo del pesticida. Todos estos resultados demuestran que en general existe efecto matriz en arroz blanco y que dicho efecto está influenciado por el compuesto y por el método de extracción.

Pesticida	Método A1	Método A2	Método A3	Método A4
Azimsulfurón	-13	-58	-47	-7
Azoxistrobín	-0,7	-23	-36	-2
Bensulfurón-metil	-13	-50	-50	-2
Bentazone	9	-5	-7	-0,2
Bispiribac sodio	-32	9	-42	-2
Bromacilo	3	-4	-33	10
Carbaril	24	-54	-33	-0,8
Carbendazím	-2	-12	-29	4
Carbofurán	8	-21	-39	6
Clomazone	2	-28	-33	17
Cihalofop-butil	-1	-19	-51	4
Diazinón	21	21	-29	17
Difenoconazol	30	52	-56	25
Diflubenzurón	35	2	-51	32
Dimetoato	2	-15	-34	-4
Edifenfos	20	-3	-48	11
Epoxiconazol	9	21	-40	14
Etiofencarb	6	-53	-24	0,2

Fipronil	-21	51	-26	-30
Fluroxipir	-6	-2	-41	4
Flutolanil	12	-25	-40	9
Imazapic	-12	19	-29	-7
Imazapir	-8	-4	-28	-1
Imazaquín	-1	1	-24	1
Imazosulfurón	-5	-35	-37	-6
Imidacloprid	7	-12	-39	5
Iprodiona	12	52	-6	15
Kresoxim-metil	44	53	41	33
Malatión	16	-79	-36	6
Metsulfurón-metil	-21	-51	-51	-13
Molinato	34	-25	-39	48
Oxydemetón metil	2	-20	-44	-6
Picoxistrobín	26	-31	-41	18
Pirazosulfurón-etil	-5	-44	-44	-4
Pirimifós-metil	30	32	-34	27
Procloraz	9	-	-54	9
Propanil	14	34	-27	24
Propaquizafop	76	7	-53	30
Propiconazol	22	61	-50	22
Piraclostrobín	17	-26	-45	15
Piridafentión	21	4	-42	16
Quinclorac	-8	-27	-46	-1
Quinoxifen	37	60	-50	40
Spiroxamina	26	58	-42	15
Tebuconazol	18	30	-53	19
Tebufenozide	14	16	-30	8
Temefós	36	17	-54	41
Tiacloprid	7	-32	-32	6
Tiametoxam	-7	-18	-52	-4
Tiofanato-etil	-18	-48	-44	-42
Triadimefón	6	38	-39	16
Triadimenol	6	20	-35	11
Tricyclazol	3	-16	-30	6
Trifloxistrobín	26	23	-45	25
Triflumizol	25	40	-49	27
Triflumurón	31	24	-56	24
2,4D	4	22	-22	-0,1
3,4-dicloroanilina	-15	13	-26	6

Tabla 43. Efecto matriz de los pesticidas para los 4 métodos estudiados utilizando 7,5 g de arroz blanco.

Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS

La cantidad de co-extractivos obtenidos durante el proceso de extracción de una muestra es un factor importante a determinar durante el desarrollo de una metodología porque puede afectar su performance y también condicionar el mantenimiento del instrumento y la columna cromatográfica. La complejidad de algunas matrices tiende a disminuir la vida útil de las columnas cromatográficas y de los sistemas de inyección, e incluso puede provocar problemas en los sistemas de ionización y detección de los instrumentos.⁽²³⁹⁾ Una de las posibles soluciones para evitar estos problemas es obtener el extracto a analizar lo más “limpio” posible, pero en el caso del análisis cuantitativo, esto a veces es un inconveniente ya que para esto es necesario aumentar el pre-tratamiento de la muestra con la consecuente disminución del % Rec. Para esto se debe llegar a un compromiso entre la “cantidad de muestra en el extracto final” y los LOD y % Rec requeridos. En estos casos una solución razonable es tratar de introducir la menor cantidad de componentes en el instrumento.

En este trabajo se evaluaron los perfiles cromatográficos obtenidos para los 4 métodos estudiados y las diferentes cantidades de muestra a 300 µg/kg. En general se observó que, la cantidad de co-extractivos en el extracto final aumenta a medida que aumenta la masa de muestra utilizada, para los 4 métodos evaluados. Sin embargo esta tendencia no es directamente proporcional y podría deberse a un comportamiento no lineal de la solubilidad de los componentes o a umbrales de competencia entre las interferencias y los analitos durante el proceso de ionización.⁽¹⁹⁴⁾

Al comparar un método para las 3 masas de muestra evaluadas (5; 7,5 y 10 g) que implica una concentración de 0,33; 0,5 y 0,66 g de muestra/mL de extracto, se obtuvieron diferentes resultados dependiendo de la cantidad de muestra usada. La **Figura 57** muestra el TIC obtenido para el método A4 para las diferentes cantidades de muestra. Como se puede observar los TIC para 5 y 7,5 g son similares aunque 7,5 g presenta una mayor cantidad de co-extractivos. Mientras que el TIC correspondiente a 10 g de muestra presenta claramente una mayor cantidad de co-extractivos, sin embargo no existe una relación lineal entre la masa usada y la intensidad de los perfiles obtenidos.

Como se mencionó anteriormente, esto puede deberse a que mayores cantidades de muestra producen un mayor número de iones que saturan el detector, pudiendo ser este comportamiento no lineal.

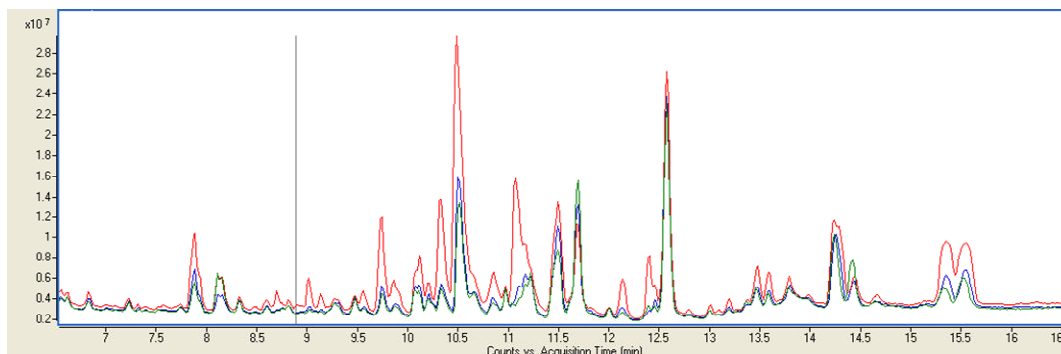


Figura 57. Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatograma de iones totales a 300 µg/kg obtenido usando el método A4, con los 3 tamaños de muestra evaluados: 5 (línea verde); 7,5 (línea azul) y 10 g (línea roja).

De acuerdo a la **Figura 58**, trabajando con 7,5 g de arroz blanco se obtienen extractos más limpios con los métodos A2 y A4 mientras que el método A1 presenta extractos más sucios. El TIC obtenido con el método A3 varía a lo largo del cromatograma; hasta un tiempo de 8 min presenta una mayor concentración de co-extractivos, mientras que al final del cromatograma el perfil obtenido es similar al de los otros métodos.

Era de esperar que para los métodos A1 y A2 que incluyen etapas de clean-up se observara una menor cantidad de co-extractivos. Estas suposiciones se confirmaron en el caso del método A2 pero no para el método A1; incluso el método A4, que no involucra una etapa de clean-up mostró un cromatograma más limpio que el del método A1. Una posible explicación de este comportamiento son las diferencias en el pH del extracto final en cada uno de los métodos. El pH obtenido en el método A1 fue 8,4 mientras que el del método A4 fue 6,3, por lo que se podría decir que el pH básico del método A1 podría influenciar la co-extracción de componentes de la matriz, aumentando la complejidad del cromatograma.⁽¹⁹⁴⁾

Por otro lado se encontraron diferencias en los perfiles obtenidos para los métodos A1 y A2, a pesar de que el pH luego del clean-up es similar en ambas metodologías (aproximadamente 8), el clean-up del método A2 involucra el uso

de C-18, que interacciona con compuestos lipofílicos y otros componentes de la matriz, pudiendo ser ésta la causa de las diferencias en los perfiles obtenidos.

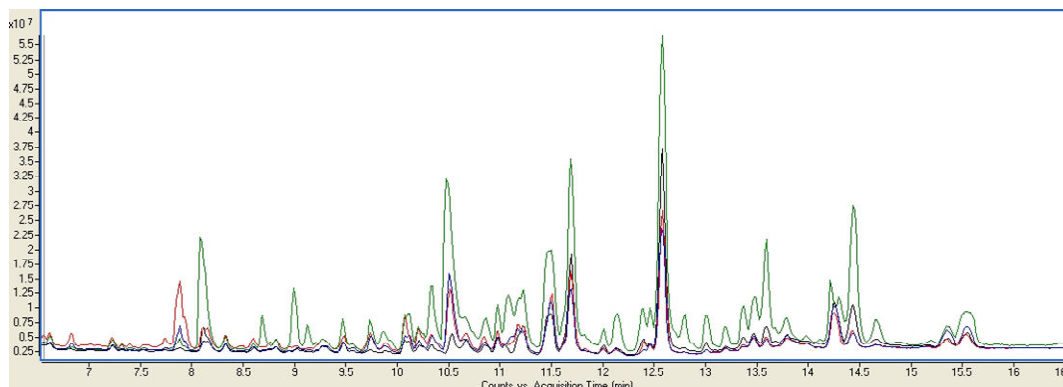


Figura 58. Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatograma de iones totales a 300 µg/kg obtenido a partir de 7,5 g de muestra con los 4 métodos evaluados: método A1 (línea verde); método A2 (línea azul), método A3 sin clean-up (línea roja) y método A4 (línea negra).

Por último se compararon los métodos método A2 y A3 que se corresponden a los métodos QuEChERS citrato con y sin clean-up respectivamente. Básicamente, los resultados muestran como era de esperar, perfiles más complejos para las tres cantidades de muestra evaluadas en el método que no utiliza clean-up con C-18 y PSA.^(134,153,194) Curiosamente, como se observa en la **Figura 59** donde se comparan los co-extractivos obtenidos con ambos métodos, a partir de los 11 min en el cromatograma obtenido con el método A2, se observa una mayor concentración de co-extractivos que con el método A3. Esto se puede deber a diferencias en el pH durante la extracción (pH 8 para el método A2 vs. pH 6,4 para el método A3). De acuerdo a lo discutido en la **Figura 58**, pH altos proveen extractos más complejos por lo que podría ser que algunos componentes se extraen cuando el pH es cercano a 8 y no cuando el pH es más bajo.

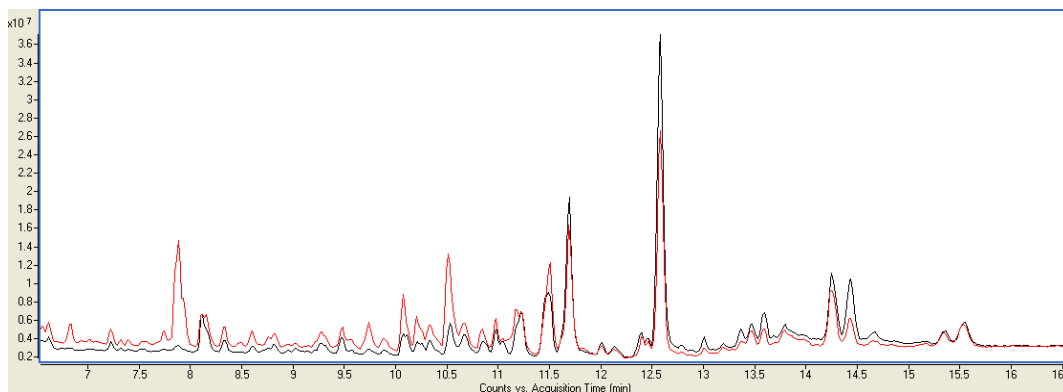


Figura 59. Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatograma de iones totales a 300 µg/kg obtenido a partir de 7,5g de muestra con el método A2 (línea negra) método A3 (línea roja).

18.3.2.8. Análisis de muestras reales

Se realizó el análisis de 19 muestras reales comerciales de diferente procedencia con los métodos A1, A2 y A4. Se utilizaron varios métodos por la diferente capacidad que mostraron para la determinación de los pesticidas.

De las 19 muestras analizadas se detectaron los siguientes compuestos: el herbicida quinclorac en 2 muestras, el fungicida tebuconazol en 5 muestras, el imidacloprid en 3 muestras y el carbendazím en 1 muestra. Salvo el quinclorac, que no pudo ser confirmado por la ausencia de una segunda transición en el método desarrollado, los demás compuestos fueron determinados sin inconvenientes. La **Figura 60** muestra la concentración promedio encontrada en arroz blanco de los pesticidas antes mencionados.

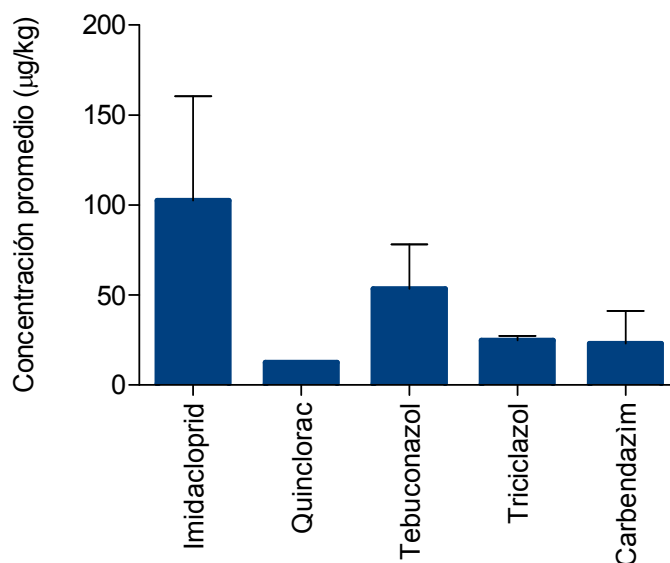


Figura 60. Concentración promedio de los pesticidas detectados en muestras de arroz blanco. Las barras indican la concentración máxima encontrada.

18.3.3. Conclusiones parciales de los resultados obtenidos para arroz blanco mediante LC-QqQ/MS y LC-TOF/MS

-La comparación de las 4 metodologías basadas en el método QuEChERS mostró que ninguno de los métodos evaluados permite cubrir el análisis de todos los pesticidas seleccionados. Por lo que a la hora del análisis es necesario definir los pesticidas de interés para la selección del método.

-Con respecto a la cantidad de muestra a utilizar para el análisis, tanto con 5 g como con 7,5 g de muestra se obtienen buenos resultados, siendo mejores con 7,5 g. Además, el uso de 7,5 g no presenta un gran aumento de co-extractivos en comparación con los generados con 5 g. Por lo que para arroz blanco el uso de 7,5 g de muestra es indicado.

-El estudio cuantitativo del EM se complementó realizando la determinación por LC-TOF/MS de los co-extractivos y evaluando cualitativamente los perfiles obtenidos según la cantidad de masas y el método evaluado.

-La metodología desarrollada fue aplicada para la determinación de muestras reales en las que se detectaron diversos pesticidas utilizados en cultivos de arroz; tebuconazol, imidacloprid y carbendazím.

18.4. Validación de método de análisis de pesticidas en arroz paddy mediante LC-QqQ/MS

18.4.1. Selección de los pesticidas

La selección de los analitos fue la misma que para el método desarrollado para el análisis de aguas mediante LC-QLIT/MS. La **Figura 61** muestra los TICs en modo ESI positivo y negativo de un extracto de arroz blanco fortificado a 100 µg/kg obtenidos en las condiciones descritas en la sección **10.5.2**.

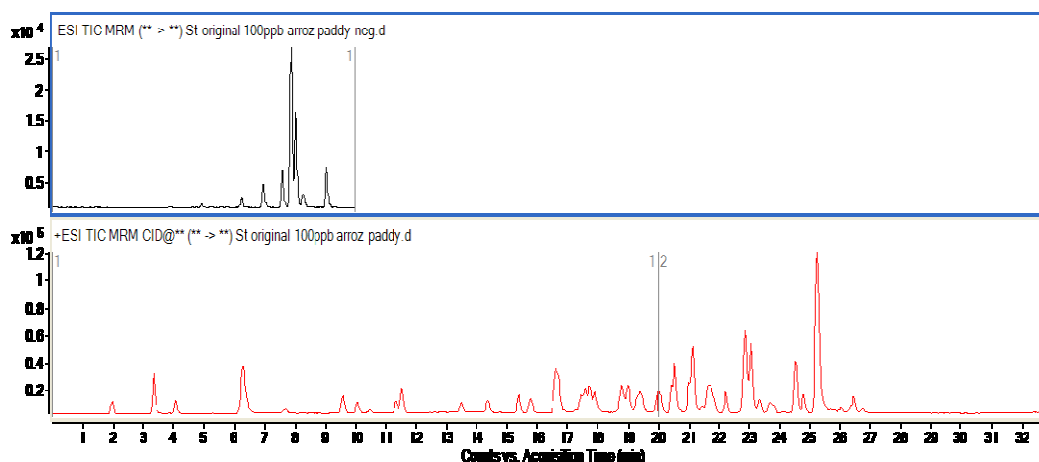


Figura 61. Cromatograma de iones totales a 100 µg/kg en extracto de arroz paddy obtenido con el método A1 y analizado con el método en descrito en la sección **10.5.2**

18.4.2. Validación de la metodología en arroz paddy

18.4.2.1. Selección de la cantidad de muestra

Los resultados presentados durante la selección de la cantidad de muestra para arroz blanco, determinaron que los % Rec. fueron muy aceptables para 7,5 g y relativamente aceptables para 5 g. Dada la complejidad de la muestra de arroz paddy y en base a los resultados obtenidos para arroz blanco se decidió utilizar 5 g de arroz paddy para la validación de la metodología. De esta forma se espera que el uso de una menor cantidad de muestra brinde

resultados aceptables con menor cantidad de co-extractivos en el extracto final y un menor efecto matriz.

18.4.2.2. Estudio de Recuperación

18.4.2.2.1. Métodos de extracción y clean-up

Dada la complejidad de la muestra y la experiencia previa de los resultados obtenidos para arroz blanco se realizaron estudios preliminares en los cuales se testearon los mismos métodos evaluados para arroz blanco, método A1, A2, A3 y A4 y además se incorporó el método QuEChERS acetato (A5), todos descriptos en la **Tabla 41**.

Estos estudios preliminares mostraron que los métodos que no incluían una etapa de clean-up; A3 y A4 presentaban malas recuperaciones y altos % RSD. Por lo que se continuó el estudio con los otros 3 métodos.

Los estudios de recuperación se realizaron a partir de una muestra de arroz fortificada a 20 y 200 µg/kg para los 3 métodos evaluados; A1, A2 y A5. Como se presenta en la **Tabla 44** solamente 46 de los 66 pesticidas seleccionados presentaron buenos % Rec. con alguno de los métodos estudiados. El 2,4 D, triflumurón, triflumizol, trifloxistrobín, tiofanato-etil, tebufenozide, piraclostrobín, propiconazol, procloraz, molinato, imazaquín, imazapir, imazapic, etiofencarb, edifenfos, diflubenzurón, difenoconazol y 3,4-dicloroanilina fueron excluidos de la validación por presentar bajas recuperaciones con todos los métodos evaluados. Comparando estos resultados con los obtenidos para arroz blanco existen diferentes situaciones. Como se discutió en la sección **18.3.2.2**, las imidazolinonas, en arroz blanco presentaban buenas recuperaciones sólo con el método A3, que como se explicó anteriormente fue descartado en los estudios preliminares. Otros pesticidas como el triflumurón, triflumizol, trifloxistrobín, difenoconazol, piraclostrobín, procloraz y 3,4-dicloroanilina presentaron bajos % Rec. al igual que en arroz blanco. Por lo que se podría decir que las condiciones de extracción y clean-up evaluadas no son adecuadas para el análisis de estos compuestos en ambos tipos de arroz. Finalmente, el tiofanato-etil, tebufenozide, propiconazol, etiofencarb, edifenfos y

diflubenzurón presentaron % Rec. no aceptables y menores a los obtenidos para arroz blanco.

El quinclorac, al igual que en arroz blanco sólo presentó % Rec. aceptables con el método A2.

Para aquellos pesticidas que presentaron porcentajes de recuperación aceptables, las RSDs fueron en general menor que 20%.

Resultados y Discusión

Pesticidas	Método A1		Método A2		Método A5	
	% Rec. (% RSD)	% Rec. (% RSD)	% Rec. (% RSD)	% Rec. (% RSD)	% Rec. (% RSD)	% Rec. (% RSD)
	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg
Azimsulfurón	91 (19)	100 (13)	70 (6)	84 (12)	84 (9)	86 (5)
Azoxistrobín	101 (7)	89 (3)	88 (2)	100 (6)	92 (13)	70 (3)
Bendiocarb	74 (7)	94 (12)	71 (3)	105 (3)	105 (8)	86 (5)
Bensulfurón-metil	98 (11)	112 (6)	75 (8)	87 (4)	90 (10)	86 (5)
Bentazone	80 (9)	95 (6)	73 (6)	102 (7)	72 (4)	89 (1)
Bispiribac sodio	105 (15)	102 (9)	118 (21)	86 (17)	92 (19)	96 (20)
Bromacilo	83 (9)	111 (8)	87 (3)	91 (6)	81 (4)	71 (5)
Carbaril	77 (5)	102 (15)	83 (6)	89 (8)	78 (7)	68 (9)
Carbendazím	97 (11)	94 (9)	75 (6)	86 (4)	34 (6)	76 (4)
Carbofurán	87 (10)	116 (5)	80 (6)	108 (3)	83 (8)	88 (3)
Clorotolurón	74 (10)	88 (5)	81 (5)	101 (3)	68 (7)	75 (2)
Clomazone	115 (9)	88 (5)	91 (7)	102 (6)	62 (3)	66 (5)
Ciproconazol	124 (19)	91 (16)	67 (10)	113 (27)	65 (11)	45 (5)
Diazinón	70 (14)	77 (10)	59 (14)	31 (21)	75 (10)	80 (8)
Dietofencarb	84 (8)	109 (4)	87 (8)	97 (3)	68 (6)	59 (3)
Difenoxyurón	75 (9)	94 (2)	97 (5)	102 (20)	67 (9)	64 (3)
Dimetoato	75 (11)	104 (6)	80 (7)	94 (5)	85 (2)	87 (5)
Diurón	74 (67)	99 (8)	95 (6)	105 (2)	67 (4)	72 (3)

Resultados y Discusión

Epoxiconazol	69 (11)	77 (11)	65 (6)	67 (9)	77 (14)	74 (17)
Fenobucarb	76 (7)	95 (12)	86 (7)	101 (3)	69 (6)	64 (3)
Fenuron	72 (11)	92 (3)	89 (6)	103 (6)	90 (8)	89 (7)
Flutolanil	82 (6)	103 (5)	84 (3)	92 (5)	48 (11)	33 (7)
Imazosulfurón	90 (14)	90 (10)	77 (10)	72 (22)	98 (6)	91 (13)
Imidacloprid	72 (11)	109 (10)	86 (6)	93 (8)	91 (16)	81 (3)
Iprodiona	84 (7)	84 (11)	69 (19)	70 (4)	63 (8)	64 (18)
Isoprocab	74 (6)	111 (9)	92 (8)	105 (4)	80 (10)	78 (4)
Isoprotiolane	71 (5)	70 (7)	83 (12)	83 (6)	42 (10)	37 (2)
Isoproturón	76 (8)	98 (5)	76 (2)	105 (4)	72 (4)	85 (3)
Malatión	75 (3)	105 (9)	69 (4)	94 (7)	58 (1)	50 (4)
Metsulfurón-metil	69 (9)	65 (8)	62 (16)	52 (28)	82 (11)	86 (6)
Oxidemetón-metil	92 (7)	93 (4)	73 (8)	97 (5)	86 (8)	99 (4)
Picoxistrobín	71 (9)	61 (9)	72 (2)	72 (7)	17 (18)	17 (21)
Pirazosulfurón-etil	84 (11)	88 (6)	65 (10)	65 (15)	99 (16)	79 (11)
Pirimicarb	89 (13)	107 (4)	89 (7)	106 (3)	94 (4)	94 (4)
Pirimifós-metil	48 (17)	43 (15)	82 (8)	95 (18)	86 (20)	89 (5)
Piridafentión	75 (4)	94 (5)	90 (6)	84 (8)	47 (11)	41 (8)
Promecarb	79 (5)	95 (8)	77 (5)	100 (5)	60 (8)	54 (3)
Propanil	87 (14)	94 (12)	79 (6)	86 (8)	79 (2)	51 (2)
Quinclorac	31 (5)	55 (10)	73 (11)	66 (6)	N.D.	N.D.
Spiroxamina	44 (16)	52 (10)	106 (3)	66 (3)	78 (17)	75 (21)
Tebuconazol	65 (14)	67 (11)	69 (23)	69 (8)	48 (20)	41 (20)
Tiacloprid	95 (11)	93 (11)	86 (2)	77 (8)	62 (8)	65 (6)
Tiametoxam	91 (8)	83 (7)	82 (8)	97 (7)	85 (5)	102 (2)
Triadimefón	89 (9)	87 (7)	73 (9)	86 (5)	52 (6)	33 (10)
Triadimenol	85 (11)	85 (11)	93 (8)	89 (7)	48 (10)	45 (7)
Triazofós	61 (5)	62 (12)	79 (4)	79 (8)	42 (18)	43 (7)
Triciclazol	85 (10)	77 (4)	78 (7)	80 (6)	88 (7)	77 (3)

Tabla 44. % Rec. y % RSD obtenidos mediante LC-QqQ/MS para todos los pesticidas seleccionados en arroz paddy con los 3 métodos estudiados a 20 y 200 µg/kg, (n=5). N.D.; No Detectado. Pesticidas en negrita: analizados en modo negativo.

18.4.2.3. Repetitividad y Reproducibilidad intra-laboratorio

La repetitividad obtenida para los 4 métodos se presenta en la **Tabla 44**. En general fue menor a 20% para todos los pesticidas estudiados. La reproducibilidad se evaluó a partir del análisis en diferentes días, observándose % RSD en el rango 8-20%.

18.4.2.4. LOD y LOQ

Los LODs se estimaron para todos los métodos evaluados, observándose LODs del mismo orden de concentración entre los diferentes métodos. De los 66 compuestos seleccionados 45 presentaron LODs en rango 2,5 a 5 µg/kg lo que cumple con los niveles exigidos por la regulación (EC) No. 299/2008.⁽²⁷⁹⁾ Además en ese rango de concentraciones la transición de cuantificación mostró una S/N mayor que 10 por lo que se fijó dicha concentración como el LOQ. El resto de los pesticidas presentaron LODs mayores a 10 µg/kg.

18.4.2.5. Linealidad

Todos los pesticidas presentaron una linealidad aceptable, con $r^2 \geq 0,998$, tanto en solvente como en matriz, en el rango 5-500 µg/kg.

18.4.2.6. Efecto Matriz

Al igual que para arroz blanco y dada la complejidad del arroz paddy, se evaluó el efecto de la matriz de forma cuanti y cualitativa.

Efecto matriz mediante LC-QqQ/MS

La mayoría de los pesticidas presentaron efecto matriz ya sea aumento o supresión de la señal, por lo que para evitar errores durante la cuantificación, ésta se realizó a partir de la curva de calibración en matriz, de acuerdo a lo que estipula la DG- SANCO.⁽²³³⁾

El efecto matriz predominante fue el de supresión de la señal. Como se muestra en la **Figura 62** el método A5 fue el que presentó menor EM, donde 30 pesticidas presentaron un efecto matriz $\leq 25\%$. Algunos pesticidas, como el tebuconazol, pirimifós-metil, iprodiona, epoxiconazol, diazinón y ciproconazol, presentaron un EM importante, para los tres métodos evaluados, pudiendo en algún caso ser el causante del bajo % Rec. obtenido. Algunos de los pesticidas excluidos de la validación por presentar bajos % Rec., tales como propaquizafop, piraclostrobín, triflumizol, entre otros presentaron un EM muy elevado, en el rango 65 a 80%.

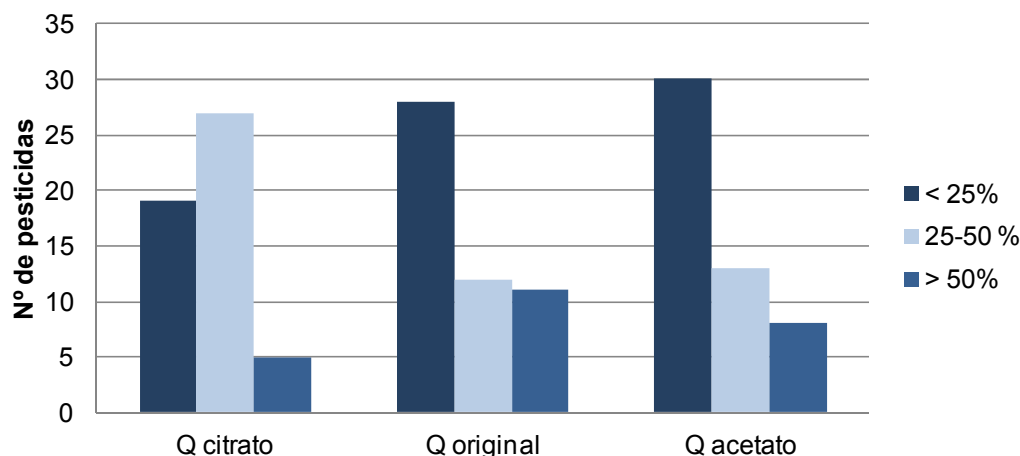


Figura 62. Comparación del efecto matriz, en arroz paddy de los métodos evaluados, expresado en nº de pesticidas.

Estudio de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS

Se evaluaron los perfiles cromatográficos obtenidos para 2 de los métodos estudiados, A1 (negro) y A2 (azul) con el fin de evaluar los co-extractivos presentes en el extracto final en diferentes condiciones. (**Figura 63**).

A partir de los cromatogramas se deduce que el extracto obtenido con el método A1 presenta una mayor cantidad de co-extractivos. Una posible explicación es el uso de C-18 en el método citrato durante la etapa de clean-up, que contribuye a una disminución de interferentes, en particular compuestos lipofílicos.

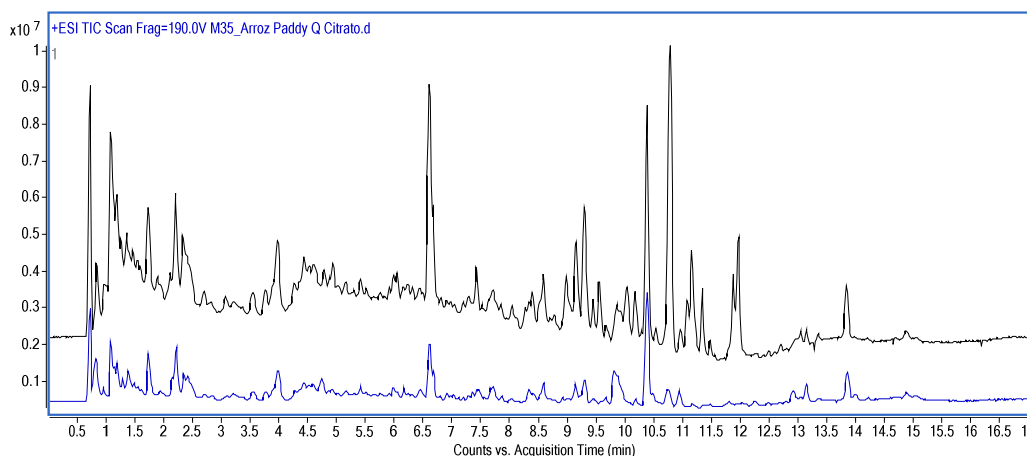


Figura 63. Estudios de los co-extractivos mediante LC-TOF/MS. Cromatogramas de iones totales obtenido para 5 g de arroz paddy mediante el método A1 (negro) y A2 (azul).

18.4.2.7. Análisis de muestras reales

Se realizó el análisis de 3 muestras reales; una muestra presentó tebuconazol a 23 ± 3 $\mu\text{g/kg}$ y otra se detectó tebuconazol a 16 ± 2 $\mu\text{g/kg}$, un fungicida muy utilizados en cultivos de arroz.

18.4.3. Conclusiones parciales de los resultados obtenidos para arroz paddy mediante LC-QqQ/MS

-La comparación de las diferentes metodologías basadas en el método QuEChERS demostró que el arroz paddy es una matriz muy compleja por lo que solamente se utilizaron métodos de extracción con clean-up.

-Muchos de los pesticidas validados para arroz blanco no cumplieron con los requerimientos de la DG-SANCO por lo que no pudieron incluirse en la validación.

-Los métodos que mostraron mejores resultados fueron el QuEChERS original y el QuEChERS citrato que permitieron el análisis de 42 pesticidas cada uno.

-Estas metodologías fueron aplicadas para la determinación de muestras reales en las que se detectó tebuconazol, un fungicida ampliamente usado en cultivos de arrozl.

Residualidad de pesticidas en el procesamiento del arroz

19. Distribución de residuos de pesticidas aplicados en condiciones controladas en campo, en diferentes productos obtenidos durante el procesamiento de arroz

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución y presencia de pesticidas en toda la cadena alimentaria del arroz; incluyendo el cultivo y las diferentes commodities obtenidas luego de su procesamiento. Para esto se aplicaron 15 pesticidas (azoxistrobín, bispiribac sodio, λ -cihalotrina, clomazone, difenoconazol, epoxiconazol, isoprothiolane, kresoxim-metil, propanil, quinclorac, tebuconazol, tiametoxam, tricloclazol, trifloxistrobín y carbendazím), a un cultivo de arroz, en condiciones controladas en campo, descritas en la sección **14** y luego de cosechado, el arroz obtenido fue procesado para obtener los distintos productos y subproductos de la industrialización del arroz.

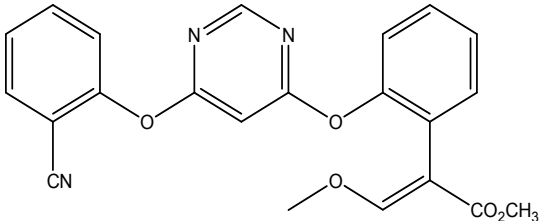
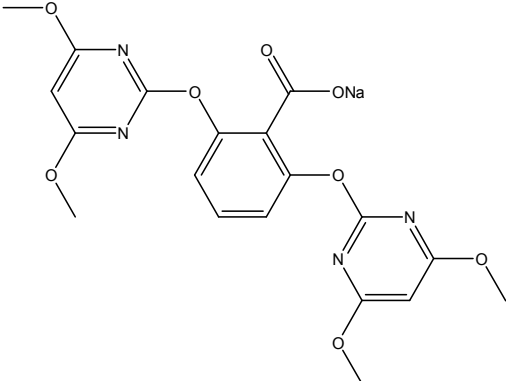
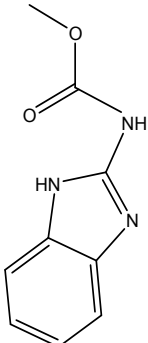
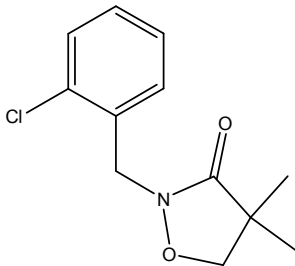
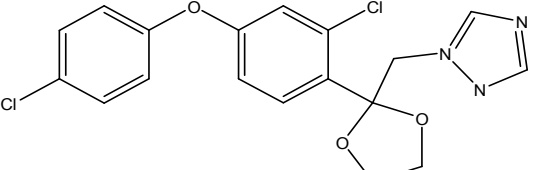
Por otra parte, en la literatura existen reportes acerca de la diferencia que existe desde el punto de vista analítico entre realizar estudios de recuperación en matrices fortificadas es decir, muestras a las cuales se les adiciona una cantidad conocida de pesticidas y utilizar matrices reales (“incurred residues”). Se entiende como “incurred residue”, aquellas muestras que han sufrido una aplicación de pesticidas durante su producción y que finalmente contienen residuos de algunos de los pesticidas aplicados.⁽²⁶⁸⁾

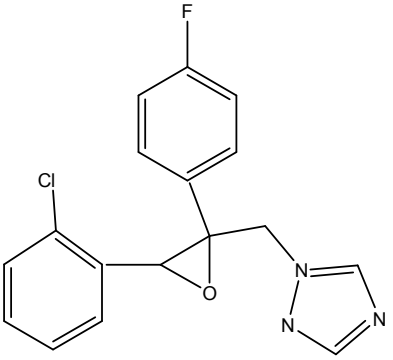
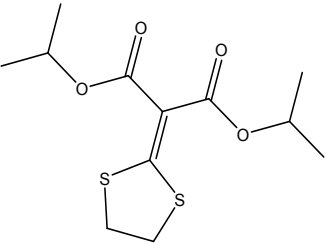
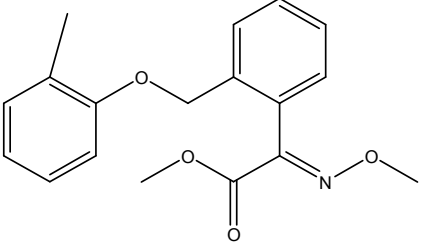
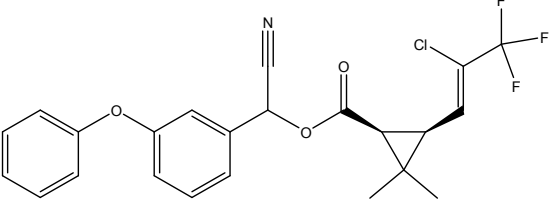
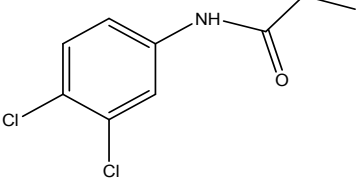
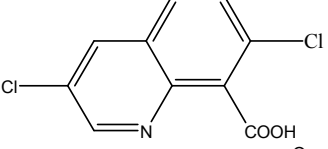
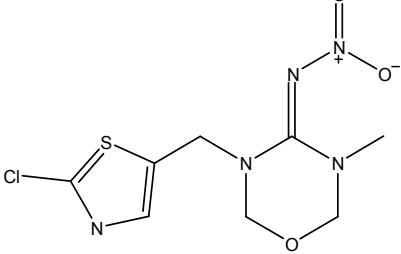
Se sabe que la interacción de residuos de pesticidas cuando estos son aplicados durante el cultivo, por ejemplo, son muy distintas a los procesos pesticida-matriz que ocurren cuando una muestra “blanco” es fortificada con pesticidas previo a su análisis. Además existen reportes de que la extractabilidad de los pesticidas en ambos casos es diferente debido a que los “incurred residues” pueden estar encerrados en células, vacuolas o partículas de cera o incluso pueden estar participando de fuertes interacciones no covalentes con componentes de la matriz y por lo tanto no ser fácilmente accesibles para su extracción.

Aprovechando las distintas commodities de arroz obtenidas durante este trabajo, se decidió analizar el contenido de residuos de pesticidas mediante dos métodos de extracción y clean-up con el fin de evaluar si existen diferencias en la extractabilidad de los métodos seleccionados.

19.1. Selección de los pesticidas

Los pesticidas utilizados en este estudio fueron elegidos por ser algunos de los más usados en cultivos de arroz en Uruguay y además se seleccionó el carbendazím debido a que desde el año 2009, la Guía de las Buenas Prácticas Agrícolas del arroz en nuestro país, sugieren el no uso de este fungicida mientras que en la UE, su uso en cultivos de arroz está autorizado. Los pesticidas seleccionados, junto con los LMR's de la UE y EEUU se presentan en la **Tabla 45**.

Pesticida	LMR UE	Estatus en la Directiva 1107/2009/EEC	LMR (mg/kg) EEUU	Estructura Química
Azoxistrobín	5,0	Incluido	5,0	
Bispiribac sodio	---	Incluido	0,02	
Carbendazím	0,01	Incluido	---	
Clomazone	0,01	Incluido	0,02	
Difenoconazol	0,05	Incluido	---	

Epoxiconazol	0,1	Incluido	---	
Isoprotiolane	0,01	No Incluido	---	
Kresoxim-metil	0,05	Incluido	---	
λ- cihalotrina	1	Incluido	1	
Propanil	0,2	No Incluido	10	
Quinclorac	5	No Incluido	5	
Tiametoxam	0,05	Incluido	0,02	

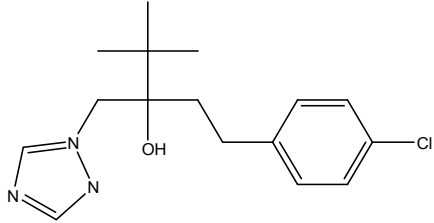
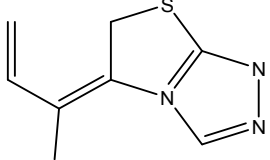
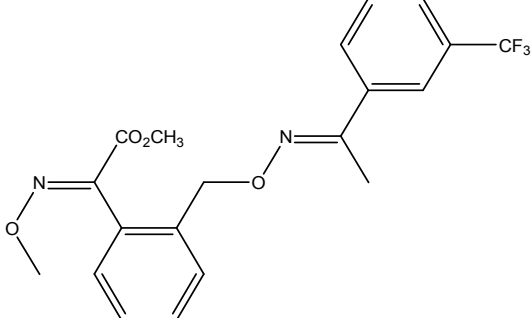
Tebuconazol	2,0	Incluido	---	
Triciclazol	1,0	No Incluido	---	
Trifloxistrobín	0,02	Incluido	3,5	

Tabla 45. Estructuras químicas, LMRs y estatus en la legislación Europea y en EE.UU. de los pesticidas seleccionados para el experimento.

19.2. Optimización de las condiciones a utilizar en LC-MS/MS y GC-MS

La optimización de los parámetros instrumentales para cada uno de los analitos incluidos en los métodos optimizados en LC se comentó en la sección **18.3**. En todos los casos se seleccionó como ión precursor el ión molecular protonado $[M+H]^+$ en modo positivo y desprotonado $[M-H]^-$ para el modo negativo ya que presentaron la máxima abundancia (**Tabla 21 y 22**). Una vez establecido el ión precursor y su voltaje de fragmentación se seleccionaron 2 iones producto y sus CE óptimas. Por otro lado, a pesar de que el difenoconazol y el kresoxim-metil son compatibles con el análisis mediante LC-MS/MS presentaron problemas de sensibilidad y no pudieron ser determinados adecuadamente, por lo que se incluyeron en el método de GC-MS. En la **Tabla 46** se encuentran los diferentes pesticidas analizados y el método instrumental utilizado.

Los análisis mediante GC-MS fueron realizados en modo SIM. Se utilizaron 3 iones como criterio de identificación de acuerdo a lo establecido con el

documento de la DG SANCO.⁽²³³⁾ El ión más abundante se usó para la cuantificación y los demás para la identificación de los analitos. En la **Tabla 24** se presentan los iones seleccionados con sus abundancias relativas y los tiempos de retención. La cuantificación se realizó a partir de un estándar interno, TPP, con el cual se calculó el factor de respuesta para cada compuesto y a partir de éste se calculó la concentración de cada compuesto en las diferentes muestras.

Pesticida	Técnica instrumental
Azoxistrobín	LC-MS/MS; GC-MS
Bispiribac sodio	LC-MS/MS
Carbendazím	LC-MS/MS
Clomazone	LC-MS/MS
Difenoconazol	GC-MS
Epoxiconazol	LC-MS/MS; GC-MS
Isoprotiolane	LC-MS/MS
Kresoxim-metil	GC-MS
λ -cihalotrina	GC-MS
Propanil	LC-MS/MS
Quinclorac	LC-MS/MS
Tebuconazol	LC-MS/MS; GC-MS
Tiametoxam	LC-MS/MS; GC-MS
Triciclazol	LC-MS/MS
Trifloxistrobín	LC-MS/MS; GC-MS

Tabla 46. Técnica instrumental seleccionada para la determinación de cada uno de los pesticidas aplicados en campo.

19.3. Validación de la metodología

19.3.1. Selección de la matriz a validar

La DG SANCO establece grupos de matrices según su composición química, contenido de agua, azúcares, ácidos, entre otros. De esta forma, al momento de la validación de un método no es necesario validar para cada una de las matrices problema sino que se puede elegir una que sea representativa de un grupo. De esta forma se valida un método para una matriz y después se extiende la validación para el resto de las matrices siempre que estén dentro del mismo grupo. El arroz, se encuentra incluido dentro de las matrices con alto contenido en almidón y/o proteína, baja tenor graso y baja humedad. Este

grupo a su vez se divide en: cereales y productos derivados y legumbres secas de leguminosas / legumbres.⁽²³³⁾

En este trabajo se eligieron 2 matrices representativas; arroz paddy y arroz blanco para la validación de las metodologías de extracción y clean-up.

19.3.2. Método de extracción y clean-up

Debido a que alguno de los pesticidas aplicados a este cultivo de arroz no habían sido incluidos en los estudios realizados previamente en arroz blanco y que hasta el momento de este experimento no se había desarrollado un método para el análisis de arroz paddy se decidió comparar diferentes metodologías de análisis para posteriormente validar la(s) metodologías que presentaran el mejor desempeño. Se evaluaron el método QuEChERS original, QuEChERS citrato, con clean-up y el QuEChERS acetato para ambas matrices, además para el arroz blanco se evaluaron los métodos de QuEChERS citrato y el QuEChERS acetato sin clean-up en dos niveles de fortificación; 20 y 200 µg/kg que fueron analizados con los métodos descritos en las secciones **10.5.2** y **10.5.6**.

Resultados y Discusión

Pesticida	QuEChERS Original		QuEChERS Citrato		QuEChERS Original		QuEChERS Citrato	
	Arroz Blanco				Arroz Paddy			
	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg
Azoxistrobín	81 (89)	99 (4)	73 (2)	112 (7)	89 (7)	101 (20)	88 (3)	103 (6)
Bispiribac sodio	83 (13)	103 (6)	127 (5)	77 (13)	102 (15)	105 (9)	92 (21)	99 (17)
Carbendazím	77 (0,3)	93 (3)	70 (2)	105 (6)	94 (11)	96 (9)	100 (6)	90 (4)
Clomazone	79 (4)	95 (6)	74 (2)	108 (6)	88 (9)	115 (5)	87 (7)	102 (6)
Difenoconazol	26 (15)	79 (2)	88 (1)	118 (8)	37 (11)	35 (15)	14 (>20)	29 (20)
Epoxiconazol	69 (7)	101 (7)	101 (10)	121 (5)	77 (11)	69 (11)	77 (11)	67 (9)
Isoprothiolane	81 (1)	79 (15)	87 (7)	117 (4)	74 (5)	71 (7)	71 (12)	96 (6)
Kresoxim-metil	N.A.	79 (9)	N.A.	105 (10)	N.A.	71 (17)	N.A.	79 (8)
Propanil	72 (3)	86 (4)	111 (5)	117 (2)	87 (6)	87 (15)	81 (6)	86 (8)
Quinclorac	44 (15)	30 (3)	52 (3)	54 (16)	32 (5)	55 (10)	48 (6)	N.D.
Tebuconazol	74 (11)	97 (5)	78 (2)	121 (7)	67 (14)	65 (11)	77 (15)	70 (8)
Tiametoxam	95 (12)	112 (3)	81 (3)	119 (6)	83 (8,)	91 (7)	101 (20)	98 (7)
Triciclazol	97 (5)	98 (6)	74 (2)	99 (3)	88 (10)	85 (3)	83 (7)	86 (6)
Trifloxistrobín	73 (17)	121 (12)	83 (23)	131 (6)	35 (16,)	N.D.	N.D.	29 (13)

Tabla 47. % de Rec. y % RSD obtenidos mediante QuEChERS citrato y original en arroz blanco y arroz paddy mediante LC-QqQ/MS a los diferentes niveles de fortificación estudiados; 20 y 200 µg/kg, (n=5). N.A.; No Analizado, N.D.; No Detectado.

Resultados y Discusión

Pesticida	QuEChERS Acetato		QuEChERS Acetato sin clean-up		QuEChERS Acetato	
	Arroz Blanco				Arroz Paddy	
	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg
Azoxistrobin	85 (6)	102 (7)	97 (7)	104 (3)	92 (13)	70 (3)
Bispiribac sodio	83 (9)	68 (24)	89 (23)	98 (17)	92 (19)	93 (20)
Carbendazim	118 (6)	99 (7)	126 (4)	95 (8)	34 (6)	76 (4)
Clomazone	75 (11)	89 (5)	92 (5)	96 (7)	62 (3)	66 (5)
Difenoconazol	21 (13)	45 (21)	29 (20)	53 (>20)	85 (15)	N.D.
Epoxiconazol	45 (9)	30 (>20)	47 (12)	61 (17)	77 (14)	24 (17)
Isoprothiolane	89 (10)	101 (8)	65 (1)	79 (5)	42 (10)	37 (2)
Kresoxim-metil	N.A	83 (11)	N.A	78 (14)	N.A	N.D.
Propanil	118 (7)	83 (5)	41 (6)	88 (6)	79 (2)	51 (2)
Quinclorac	N.D.	N.D.	64 (15)	27 (>20)	N.A	N.D.
Tebuconazol	51 (14)	46 (21)	73 (4)	49 (3)	48 (20)	21 (18)
Tiametoxam	88 (10)	115 (3)	113 (11)	117 (3)	85 (5)	102 (2)
Triciclazol	98 (4)	98 (3)	109 (5)	102 (3)	88 (7)	77 (3)
Trifloxistrobín	N.D.	N.D.	N.D.	55 (7)	70 (4)	N.D.

Tabla 48. % de Rec. y % RSD obtenidos para arroz blanco mediante QuEChERS acetato con y sin clean-up y para arroz paddy mediante QuEChERS acetato con clean-up mediante LC-QqQ/MS a los diferentes niveles de fortificación estudiados; 20 y 200 µg/kg, (n=5). N.A.; No Analizado, N.D.; No Detectado.

19.3.3. Estudio de Recuperación

Como se observa en las **Tabla 47-48**, los resultados obtenidos para arroz blanco y paddy con los métodos QuEChERS original, y QuEChERS citrato fueron los más eficientes. Los % Rec. a 20 µg/kg, correspondiente al nivel de concentración más exigente, fueron aceptables para la mayoría de los pesticidas en estudio (70-120%) excepto para algún caso particular como el epoxiconazol y el tebuconazol que presentaron recuperaciones más bajas en arroz paddy. Por otro lado el quinclorac además de tener problemas de sensibilidad (no se obtiene la segunda transición) no pudo ser determinado por ninguno de los métodos estudiados por presentar % Rec. menores a 60%.

Las recuperaciones obtenidas mediante GC-MS para los compuestos analizados se presentan en la **Tabla 49**. Como se puede observar en general los porcentajes de recuperación son aceptables (en el rango 70-120%) para ambas matrices con ambos métodos, como establece la DG SANCO, excepto para algunos casos puntuales en los que el % Rec. fue menor.

En las muestras reales, 3 de los pesticidas analizados, kresoxim-metil, difenoconazol y λ-cihalotrina, se analizaron mediante GC-MS únicamente mientras que para el resto de los pesticidas se informó el resultado de aquel método que presentó mejor % de Rec.

Resultados y Discusión

Pesticida	QuEChERS Citrato		QuEChERS Original		QuEChERS citrato		QuEChERS Original	
	Arroz Blanco				Arroz Paddy			
	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg	20 µg/kg	200 µg/kg
Azoxistrobín	74 (6)	73 (4)	89 (11)	118 (15)	62 (11)	86 (15)	89 (12)	83 (5)
Difenoconazol	41 (10)	72 (9)	71 (15)	124 (12)	41 (10)	90 (3)	61 (20)	79 (7)
Epoxiconazol	54 (16)	67 (4)	101 (1)	111 (9)	80 (26)	95 (11)	76 (29)	76 (5)
Kresoxim-metil	115 (10)	105 (9)	94 (13)	90 (10)	115 (10)	76 (4)	93 (5)	90 (7)
λ-cihalotrina	100 (9)	88 (10)	97 (8)	111 (9)	88 (10)	121 (3)	87 (2)	87 (1)
Tebuconazol	52 (21)	64 (8)	100 (6)	124 (10)	58 (2)	98 (3)	69 (20)	76 (3)
Tiametoxam	67 (16)	89 (6)	73 (11)	90 (15)	80 (11)	72 (6)	99 (4)	90 (6)
Trifloxistrobín	104 (13)	102 (13)	97 (10)	115 (13)	104 (13)	83 (15)	96 (7)	92 (4)

Tabla 49. % de Rec. y % RSD obtenidos mediante QuEChERS citrato y original en arroz blanco y arroz paddy mediante GC-MS a los diferentes niveles de fortificación estudiados; 20 y 200 µg/kg, (n=5).

19.3.4. Reproducibilidad intra-laboratorio

En LC-QqQ/MS, la reproducibilidad de ambos métodos fue en general muy buena, presentando valores desde 0,3 a 16% para arroz blanco y desde 2 a 21% para arroz paddy.

En GC-MS las RSD fueron en general más altas que las obtenidas mediante LC-QqQ/MS, pero igualmente aceptables, en el rango de 4 y 21% en arroz blanco y entre 3 y 26% para arroz paddy.

19.3.5. LOD y LOQ

Tanto el LOD como el LOQ para los pesticidas cumplen con los criterios de la Comisión Europea en cuanto a métodos de análisis de residuos de pesticidas.⁽²⁷²⁾

En LC-MS/MS, los LOD's de los pesticidas aplicados se encontraron en el rango 2,5-5 µg/kg, para ambas matrices y con los 2 métodos estudiados excepto para el herbicida quinclorac cuyo LOD no pudo ser determinado ya que no fue posible obtener una segunda transición y el kresoxim-metil cuyo LOD fue de 50 µg/kg. Los LOD's obtenidos mediante GC-MS fueron similares con ambos métodos de extracción, pero en general mayores a los obtenidos mediante LC-MS/MS. Kresoxim-metil presentó el menor LOD (11 µg/kg en ambas matrices) mientras que λ-cihalotrina y trifloxistrobín presentaron en arroz paddy valores mayores, alrededor de 100 µg/kg. Para arroz blanco los LOD's de λ-cihalotrina y trifloxistrobín fueron 82 y 29 µg/kg respectivamente. A los tiempos de retención de los pesticidas no se observaron interferencias, demostrando la selectividad de los métodos analíticos empleados.

19.3.6. Linealidad

Las **Tablas 50 y 51** muestran las linealidades de los pesticidas seleccionados en arroz blanco y arroz paddy para QuEChERS original y citrato mediante LC-MS/MS y GC-MS en el rango 5-500 µg/kg. En general los compuestos presentaron un comportamiento lineal con coeficientes de correlación mayores

a 0,99, excepto algunos casos como el kresoxim-metil que presentó problemas de linealidad en ambas matrices y el trifloxistrobín que presento un coeficiente de correlación de 0,81 con el método de QuEChERS citrato en arroz paddy.

Pesticida	QuEChERS Original	QuEChERS Citrato	QuEChERS Original	QuEChERS Citrato
	Arroz Paddy		Arroz Blanco	
Azoxistrobín	$y = 1438,3x + 26896$ (0,9982)	$y = 883,3x + 24831$ (0,9925)	$y = 1513,9x + 7431,2$ (0,9991)	$y = 1030,7x + 10303$ (0,9981)
Bispiribac sodio	$y = 126,0x + 1353,1$ (0,9990)	$y = 55,6x - 250,41$ (0,9994)	$y = 82,4x - 346,36$ (0,9997)	$y = 42,9x - 10,8$ (0,9984)
Carbendazím	$y = 1491,7x + 18038$ (0,9992)	$y = 1561,2x + 3880,6$ (0,9981)	$y = 1703,2x + 7657,8$ (0,9995)	$y = 1562,6x + 18488$ (0,9966)
Clomazone	$y = 795,6x - 582,7$ (0,9991)	$y = 707,6x + 270,8$ (0,9982)	$y = 701,5x + 876,3$ (0,9999)	$y = 810,9x + 2266,9$ (0,9997)
Difenoconazol	$y = 415,5x + 316,9$ (0,9988)	$y = 486,9x + 205,2$ (0,9925)	$y = 1202,9x + 5657$ (0,9950)	$y = 1524,1x + 532,9$ (0,9955)
Epoxiconazol	$y = 984,6x - 6632,9$ (0,9911)	$y = 911,5x + 3389,9$ (0,9939)	$y = 1063,2x + 7259,6$ (0,9978)	$y = 1501,5x + 1194$ (0,9999)
Isoprotiolane	$y = 1268,2x + 8660,9$ (0,9992)	$y = 860,2x + 10339$ (0,9937)	$y = 1288,4x + 5134,3$ (0,9990)	$y = 1035,8x + 3802,2$ (0,9985)
Kresoxim-metil	$y = 12,9x + 54,4$ (0,9991)	$y = 17,2x + 202,2$ (0,9829)	$y = 27,2x + 738,1$ (0,9718)	$y = 28,4x + 6,0$ (0,9994)
Propanil	$y = 117,5x - 367,5$ (0,9992)	$y = 279,1x + 996,6$ (0,9977)	$y = 365,0x + 2511,7$ (0,9982)	$y = 192,7x + 1161,7$ (0,9986)
Quinclorac	$y = 114,7x + 341,3$ (0,9991)	$y = 100,7x + 631,3$ (0,9941)	$y = 137,1x + 1537,7$ (0,9978)	$y = 106,7x + 4579,5$ (0,9985)
Tebuconazol	$y = 698,9x + 891,2$ (0,9998)	$y = 677,8x + 5866,3$ (0,9949)	$y = 988,9x + 4055,9$ (0,9985)	$y = 916,2x + 3563,1$ (0,9988)
Tiametoxam	$y = 177,0x + 846,1$ (0,9997)	$y = 136,9x + 2020,4$ (0,9948)	$y = 143,3x + 190,0$ (0,9999)	$y = 145,9x + 1434,3$ (0,9966)
Triciclazol	$y = 821,6x - 184,4$ (0,9999)	$y = 709,2x - 437,9$ (0,9926)	$y = 797,8x - 632,7$ (0,9999)	$y = 888,9x + 4673,9$ (0,9991)
Trifloxistrobín	$y = 376,68x + 5695,2$ (0,9791)	$y = 445,6x + 2761,5$ (0,9807)	$y = 711,8x + 5144,9$ (0,9973)	$y = 823,3x + 4034,9$ (0,9961)

Tabla 50. Linealidades de los pesticidas estudiados en ambas matrices con los métodos validados mediante LC-QqQ/MS.

Resultados y Discusión

Pesticida	QuEChERS Original	QuEChERS Citrato	QuEChERS Original	QuEChERS Citrato
	Arroz Paddy		Arroz blanco	
Azoxistrobín	$y = 0,7428x + 0,0165$ (0,9944)	$y = 0,7428x + 0,0165$ (0,9944)	$y = 0,6951x - 0,0055$ (0,9997)	$y = 0,6951x - 0,0055$ (0,9997)
Difenoconazol	$y = 0,5728x - 0,0003$ (0,9983)	$y = 0,5728x - 0,0003$ (0,9983)	$y = 0,5041x - 0,0335$ (0,9885)	$y = 0,4822x - 0,0211$ (0,9952)
Epoxiconazol	$y = 0,5106x + 0,0042$ (0,9966)	$y = 0,5106x + 0,0042$ (0,9966)	$y = 0,4487x - 0,024$ (0,9941)	$y = 0,498x - 0,0072$ (0,9995)
Kresoxim-metil	$y = 0,524x + 0,0169$ (0,9937)	$y = 0,524x + 0,0169$ (0,9937)	$y = 0,5443x + 0,0079$ (0,9995)	$y = 0,5443x + 0,0079$ (0,9995)
λ-cihalotrina	$y = 0,428x - 0,0016$ (0,9979)	$y = 0,428x - 0,0016$ (0,9979)	$y = 0,407x - 0,0096$ (0,9990)	$y = 0,407x - 0,0096$ (0,9990)
Tebuconazol	$y = 0,3551x - 0,0064$ (0,9994)	$y = 0,3551x - 0,0064$ (0,9994)	$y = 0,2776x - 0,0104$ (0,9951)	$y = 0,2776x - 0,0104$ (0,9951)
Trifloxistrobín	$y = 0,4192x + 0,0054$ (0,9991)	$y = 0,4192x + 0,0054$ (0,9991)	$y = 0,4013x - 0,0007$ (0,9998)	$y = 0,4013x - 0,0007$ (0,9998)

Tabla 51. Linealidades de los pesticidas estudiados en ambas matrices con los métodos validados mediante GC-MS.

19.3.7. Efecto Matriz Estudio cuantitativo del EM

Debido a la complejidad de las matrices en estudio se evaluó el EM con el fin de determinar la existencia de interferencias significativas de co-extractantes, que puedan afectar el análisis. En los experimentos realizados en GC-MS, dos pesticidas presentaron un aumento de la señal; el tiametoxam en arroz blanco 30% y 42% en arroz paddy y el tebuconazol 48% en arroz blanco y 67% en arroz paddy. Este comportamiento se observó en ambos métodos de extracción y clean-up.

En los experimentos realizados en LC-MS/MS, se observó supresión de la señal mayoritariamente, siendo mucho más pronunciada en arroz paddy que en arroz blanco (**Figuras 64 y 65**). Algunos pesticidas, tales como difenoconazol, kresoxim-metil, trifloxistrobín, tebuconazol, bispiribac sodio, carbendazím y tiametoxam no presentaron EM con ninguno de los métodos evaluados en ninguna matriz. En arroz paddy, azoxistrobín, isoprothiolane, quinclorac y triclozol presentaron un efecto matriz medio. El propanil presentó un efecto de supresión fuerte con el método de QuEChERS original, mientras que con QuEChERS citrato el EM fue moderado. En arroz blanco el efecto de los co-extractantes fue para todos los pesticidas bajo o nulo, excepto para el tebuconazol que presentó una moderada supresión de la señal con el método de QuEChERS original.

En base a los resultados obtenidos, en cuanto a la presencia de efecto matriz, principalmente en arroz paddy, se decidió realizar la cuantificación de los analitos mediante curva de calibración en matriz.

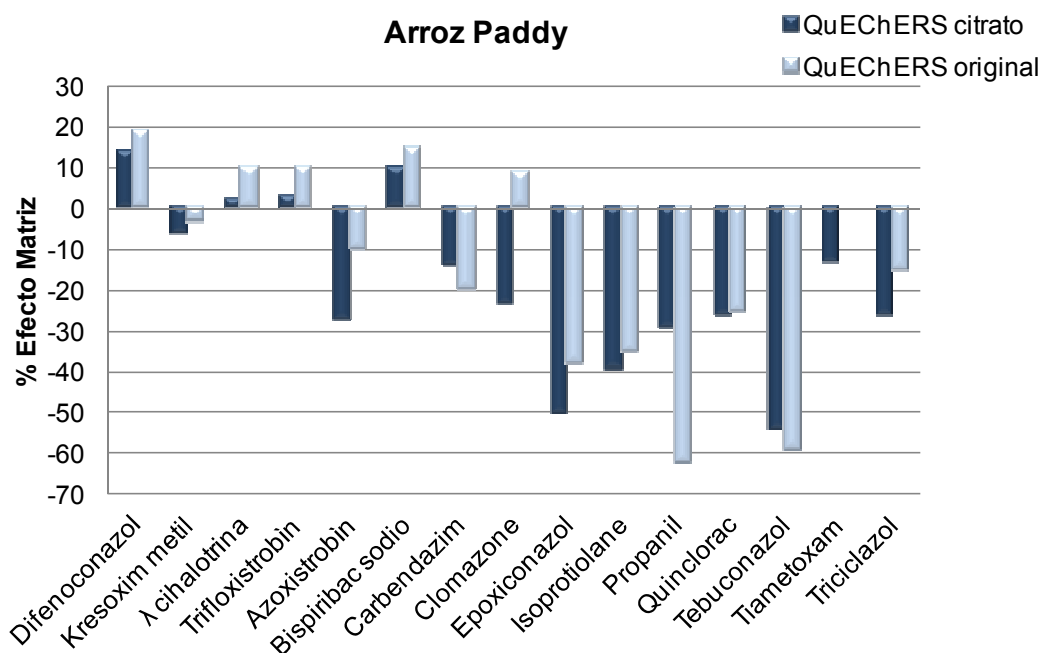
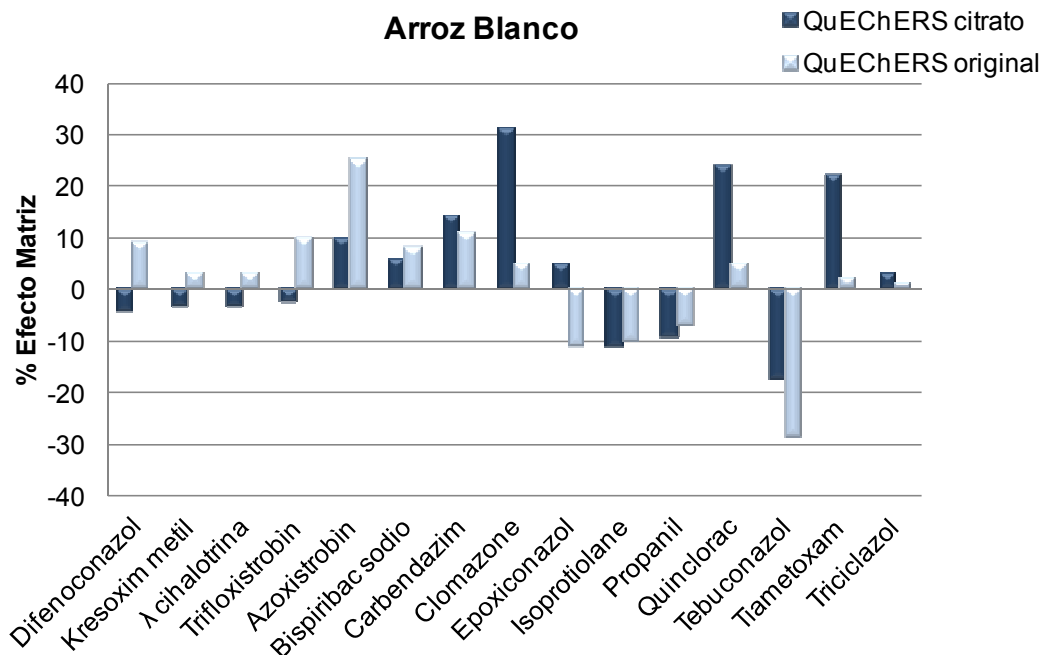


Figura 64. Efecto matriz de los pesticidas estudiados obtenidos con QuEChERS citrato y QuEChERS original en arroz paddy.



Figuras 65. Efecto matriz de los pesticidas estudiados obtenidos con QuEChERS citrato y QuEChERS original en arroz blanco.

Estudio cualitativo del EM

La **Figura 66** muestra los TICs en *full scan* obtenidos durante el análisis en GC-MS y LC-TOF/MS para ambas matrices extraídas con el método de QuEChERS original. Como se puede observar la matriz de arroz paddy presenta un perfil más complejo que el arroz blanco en el período de tiempo 8-18 min en GC-MS. Mientras que en el perfil obtenido mediante LC-MS/MS, no ocurre lo mismo sino que los perfiles son similares hasta aproximadamente los 12 min en los que el arroz blanco presenta mayor cantidad de picos por lo que podría presentar mayor cantidad de compuestos extraídos.

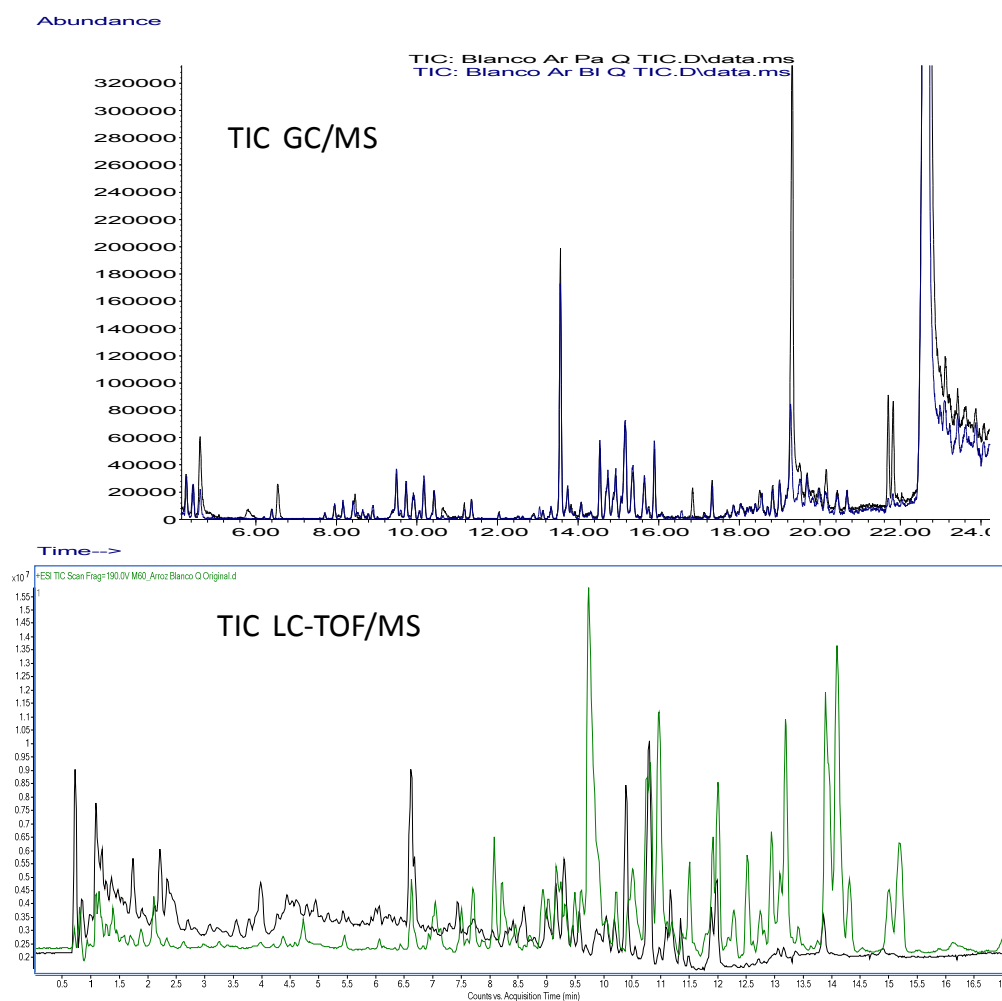


Figura 66. Cromatogramas en full scan de extractos de arroz blanco y paddy obtenidos con QuEChERS original mediante GC-MS (arriba) y LC-TOF/MS (abajo).

19.4. Extractabilidad de los pesticidas

Como se muestra en la **Figura 67** en general la cantidad extraída para cada analito en arroz paddy, integral y arroz blanco fue del mismo orden de concentración en ambos métodos. Excepto para isoprotolane y tebuconazol que en todas las matrices analizadas la concentración extraída con el método de QuEChERS original fue mayor. El triciclazol por otro lado sólo se extrajo en mayor cantidad con el QuEChERS original en arroz paddy y afrechillo pero en arroz blanco e integral las cantidades extraídas fueron similares.

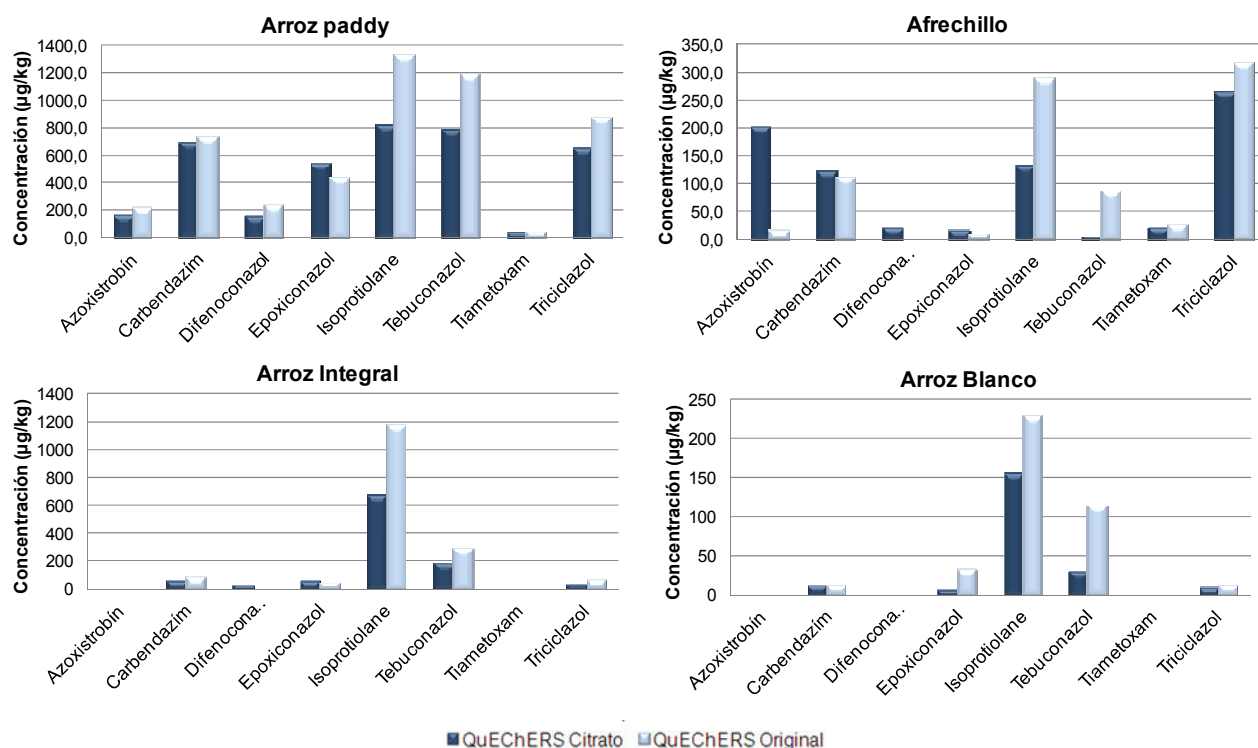


Figura 67. Comparación de las concentraciones obtenidas para los 2 métodos seleccionados en las diferentes commodities estudiadas.

19.5. Distribución de los Pesticidas

Es importante recalcar que éste fue un experimento único por lo que los datos no son suficientes para calcular los factores de procesamiento de los pesticidas, pero si pueden ayudar para estudiar la distribución de dichos residuos en arroz blanco.

La **Tabla 52** muestra la distribución de los residuos de pesticidas detectados en las diferentes commodities obtenidas durante el procesamiento del arroz junto con su correspondiente K_{ow} .⁽²⁰⁾

Pesticida	Método de Extracción	Arroz Paddy (µg/kg)	Arroz Integral (µg/kg)	Afrechillo (µg/kg)	Arroz Blanco (µg/kg)	log K_{ow}
Azoxistrobín	QuEChERS Original	210	9,0	17	< LOQ	2,5
Carbendazím	QuEChERS Original	719	81	110	12	1,4
Difenoconazol*	QuEChERS Citrato	108	9,0	155	< LOQ	4,4
Epoxiconazol	QuEChERS Original	431	44	10	32	3,3
Isoprotiolane	QuEChERS Citrato	807	656	131	153	2,8
Kresoxim-metil*	QuEChERS Citrato	64	66	< LOQ	< LOQ	3,4
λ cihalotrina*	QuEChERS Citrato	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	7,0
Tebuconazol	QuEChERS Citrato	774	178	6,0	29	3,7
Tiametoxam	QuEChERS Citrato	32	< LOQ	20	< LOQ	-0,13
Triciclazol	QuEChERS Citrato	639	34	262	9,0	1,4
Trifloxistrobín*	QuEChERS Citrato	-	< LOQ	-	-	4,5

Tabla 52. Distribución de los residuos de pesticidas detectados en las diferentes commodities evaluadas con sus correspondientes % RSD y el K_{ow} , (n=2). *Pesticidas analizados mediante GC-MS.

Generalmente la distribución de los pesticidas en los alimentos se puede explicar como la combinación de varios factores, tales como la composición química de la matriz, propiedades físico-químicas del compuesto como la lipofilia o fisiológicas, como por ejemplo, su modo de acción (sistémico o no sistémico).⁽²¹⁾

Ninguno de los herbicidas aplicados fue detectado en las diferentes matrices estudiadas. Este resultado concuerda con los análisis de más de 20 muestras reales analizadas en los laboratorios de Uruguay y España en los que tampoco se detectaron herbicidas por encima del LOQ de los instrumentos utilizados.

Sin embargo, Dors et al., reportan la presencia de clomazone y bispiribac sodio en afrechillo y arroz paddy obtenidos luego del procesamiento de una muestra de arroz tratada con dichos herbicidas en campo.⁽¹⁶⁾ Una posible explicación de estos hallazgos puede ser, las diferencias en las dosis aplicadas, la variedad de arroz, diferencias en el sistema de irrigación, así como también distintas condiciones climáticas. En el experimento realizado en Salto, Uruguay las lluvias fueron muy intensas luego de cada una de las aplicaciones de los herbicidas (631 mm al final de enero y comienzos de febrero de 2010), pudiendo estas precipitaciones haber lavado a los herbicidas o haber favorecido la lixiviación de estos compuestos, contaminando finalmente los suelos (**Figura 38**).

Con respecto a los fungicidas estudiados, algunos de estos fueron detectados en la mayoría de las commodities. Los compuestos del grupo triazol (epoxiconazol, tebuconazol y tricloclazol) se encontraron en todas las matrices analizadas, mientras que el difenoconazol y los pertenecientes al grupo de las estrobilurinas: azoxistrobín, kresoxim-metil y trifloxistrobín fueron encontrados principalmente en las matrices más lipofílicas, arroz paddy, integral y afrechillo, tal vez debido a que son compuestos lipofílicos (alta K_{ow} 's), y por lo tanto es razonable que se distribuyan en las matrices de mayor contenido lipídico. (**Tabla 9**)

Otros fungicidas como el carbendazím y el isoprotiolane también fueron detectados en todas las matrices estudiadas. Por otro lado, trifloxistrobín y λ -cihalotrina fueron detectados pero no pudieron ser cuantificados, ya que los niveles de concentración se encontraron por debajo del LOQ.

Con respecto a la distribución de los pesticidas a lo largo del proceso industrial del arroz, a partir de la **Tabla 52** se puede observar que el descascarado y el pulido del arroz causan una reducción en la concentración de los residuos de pesticidas detectados. El arroz paddy presenta el mayor número de compuestos detectados y la concentración más alta, mientras que el arroz blanco presenta los niveles de concentración más bajos.

Por otro lado se puede presumir que la diferencia en los niveles encontrados en arroz paddy y el arroz integral (en donde el proceso sufrido es únicamente el descascarado) debería encontrarse en la cáscara. Esto ocurre para algunos de

los pesticidas tales como azoxistrobín, carbendazím, difenoconazol, epoxiconazol, tiametoxam, tricyclazol y tebuconazol en donde entre el 5-20% de la cantidad encontrada en arroz paddy es detectada en arroz integral, pero el kresoxim-metil no muestra el mismo comportamiento, sino que se observa prácticamente la misma concentración en ambas matrices, indicando que este pesticida no se concentra en la cáscara sino que en este caso podría explicarse por su modo de acción sistémico.

La segunda etapa del procesamiento del arroz es el pulido del arroz integral para obtener arroz blanco. En este proceso se obtiene como sub-producto el afrechillo y el arroz medio grano. Se podría suponer que para un pesticida, la suma de sus residuos en arroz blanco y en afrechillo debería ser igual a la cantidad encontrada en arroz paddy, pero esto no se observó para la mayoría de los compuestos ensayados. Asumiendo un factor de procesamiento de 1 (sin pérdida durante el procesamiento), los residuos encontrados en el afrechillo y en el arroz blanco son mucho menores que los esperados. De todos los pesticidas aplicados solo isoprotiolane se distribuyó homogéneamente entre arroz paddy, afrechillo y arroz integral, pero no siguió dicha tendencia en arroz blanco. En este caso los residuos de isoprotiolane en arroz integral corresponden al 80% de los encontrados en arroz paddy y en afrechillo se detectó el 15% sin embargo en arroz blanco se detectó 1/5 de la concentración esperada (**Tabla 52**).

Los fungicidas tebuconazol y epoxiconazol se encontraron principalmente en arroz blanco, mientras que el difenoconazol y tricyclazol se concentraron en el afrechillo. En la **Figura 68** se observan algunos ejemplos de la distribución de los pesticidas en las diferentes commodities analizadas.

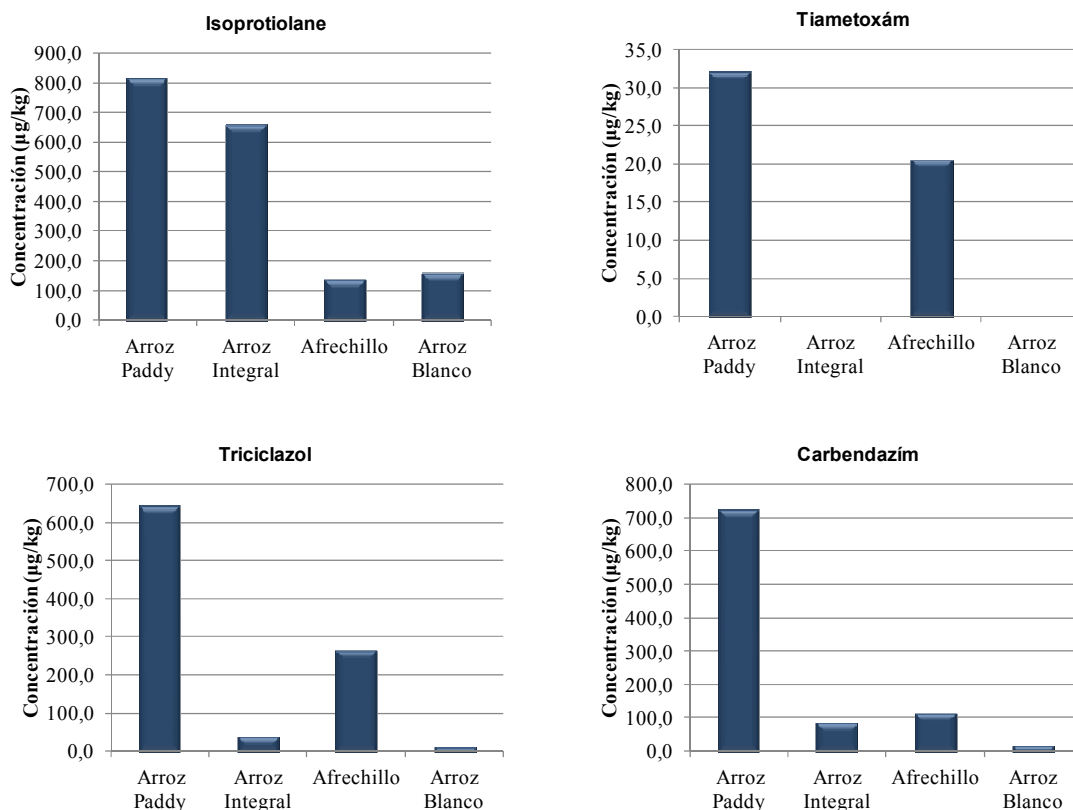


Figura 68. Ejemplos de la distribución de los residuos de pesticidas observada en las diferentes matrices analizadas.

Los resultados sugieren a su vez que el polvo producido durante el proceso de obtención de arroz integral puede contener la porción no detectada de los pesticidas estudiados. Si estos resultados fueran confirmados, sería necesario tomar precauciones para evitar la exposición de los operarios al polvo generado.

A las dosis aplicadas, los niveles encontrados en las diferentes matrices fueron menores a los correspondientes LMR fijados por la UE, excepto para el isoprotiolane y el carbendazím.

19.6. Conclusiones parciales del estudio de residualidad durante el procesamiento del arroz

-Se desarrolló un experimento a campo, en condiciones controladas que permitió estudiar la distribución de residuos de pesticidas seleccionados durante el proceso industrial del grano de arroz.

-Este estudio demostró que los herbicidas en general no permanecen en los diferentes productos obtenidos.

-El arroz paddy fue el producto que presentó mayor concentración de residuos, observándose una cierta tendencia a disminuir esta concentración a medida que el grano es procesado.

-A las dosis aplicadas, la mayoría de las concentraciones de pesticidas determinadas se encontró por debajo del LMR establecido por la UE, excepto para el isoprotiolane y el carbendazím.

-Los resultados obtenidos muestran que a priori, no existe una correlación directa entre las concentraciones halladas y los diferentes productos lo que se atribuye a distintos factores; condiciones climáticas, propiedades físico-químicas, modo de acción de los pesticidas aplicados y factores intrínsecos de la matriz.

-Para lograr conclusiones más generales habría que evaluar el comportamiento de estos pesticidas a diferentes tiempos, tomando como tiempo cero el final del proceso industrial y en diferentes condiciones ambientales, humedad, temperatura y frecuencia de precipitaciones para poder tener un dato seguro y confiable del proceso en su totalidad.

-Este estudio constituye el paso inicial de lo que debería realizarse para la determinación de factores de procesamiento durante el procesamiento del arroz.

Procesos de oxidación avanzada

20. Degradación del quinclorac mediante fotólisis directa y fotocátalisis en diferentes sistemas acuosos

La presencia y persistencia en el medio ambiente de compuestos orgánicos comúnmente utilizados como fitosanitarios en la agricultura ha sido descrita por numerosos autores. En el presente apartado se describe el estudio de la degradación fotolítica de quinclorac (QNC), un herbicida selectivo de post emergencia ampliamente utilizado en cultivos de arroz. Se seleccionó este compuesto por presentar una alta estabilidad en el medio ambiente y por ser potencialmente tóxico. Además, como se demostró en la sección de análisis de aguas mediante LC-QLIT/MS este herbicida ha sido encontrado en agua de cultivos de arroz de nuestro país, y según la reglamentación de la Unión Europea se encuentra fuera del Anexo I del reglamento 178/2006, por lo que el estudio de posibles metodologías para su degradación está justificado.^(240,280)

Actualmente existe un marcado interés en conocer la permanencia de los contaminantes y sus productos de transformación (PTs) en el ambiente, especialmente en el medio acuático. Muchas veces estos PTs son aún más tóxicos que el compuesto original por lo que un estudio detallado de dichos compuestos sería muy útil.

En ese contexto, se considera la foto-degradación solar como el principal proceso de transformación de contaminantes en aguas naturales.⁽³⁸⁾

Actualmente el conocimiento de este proceso es limitado, especialmente si se tiene en cuenta que algunos estudios han evidenciado la formación de PT cuyas consecuencias para el medio ambiente son de mayor interés que el compuesto original.⁽²⁸¹⁾

Además, desde un punto de vista analítico, la identificación de los PTs representa un gran desafío no sólo por la diversidad de productos que pueden ser generados sino también por las diferencias en las propiedades fisicoquímicas que pueden tener dichos compuestos y las bajas concentraciones a las que generalmente son producidos.

A continuación, se encuentran los principales resultados del estudio de degradación fotoquímica de QNC en distintas matrices de agua (agua ultra pura y agua de cultivos de arroz) y la identificación de los PT generados mediante LC-QTOF-MS/MS.

La comparación entre los espectros UV de una solución de QNC a 5 mg/L preparada en agua ultra pura y el espectro solar se observa en la **Figura 69**. El QNC presenta un espectro con bandas de absorción características en las longitudes de onda de 212, 242 y 265 y 329 nm. Existe un solapamiento del espectro solar y del QNC desde 300 nm hasta 329 nm, aproximadamente. Ese comportamiento es el esperado ya que los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, absorben radiación en las regiones del espectro electromagnético ultravioleta o visible. En estos casos, la absorción directa de fotones solares (fotólisis directa) puede ocasionar transformaciones en los compuestos orgánicos que están presentes en ambientes acuáticos.

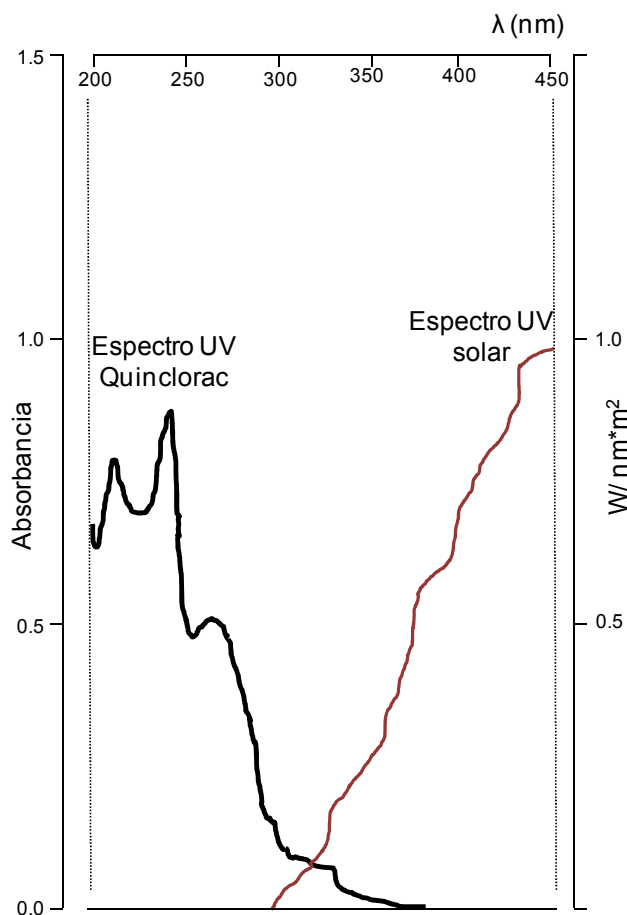


Figura 69. Espectro UV de una solución de quinclorac en agua a 5 mg/L y su superposición con el espectro solar.

20.1. Experimentos de degradación

Para el estudio de degradación del quinclorac se utilizaron 2 sistemas acuosos, agua ultra pura y agua proveniente de cultivos de arroz. Esta última, fue tomada de la zona del Parque de la Albufera, en Valencia, España y una vez transportada al laboratorio de Almería, fue analizada mediante el método descrito en la sección **10.5.4.** para verificar la ausencia QNC. Previo al análisis se midió el pH, el Carbono Orgánico Total (COT) y el Nitrógeno Total (NT). Para la medida del COD se filtraron 12-15 mL de la muestra a través de un filtro de PTFE de 0,22 μm antes de introducirla en el equipo. De esta forma se retiran los sólidos en suspensión presentes en la muestra y, por tanto, ya no es correcto notarlo como COT sino como COD. Los resultados obtenidos fueron los siguientes; pH: 7.7; COT: 60,5 mg/L y NT: 8,7 mg/L.

Con el fin de verificar la ausencia de hidrólisis durante el transcurso de este trabajo se realizaron experimentos de degradación en medio ácido, básico y al abrigo de la luz de una solución de quinclorac a 1 mg/L durante dos meses. Durante este período se tomaron 5 alícuotas, analizando dichas muestras mediante LC-QTOF/MS en modo positivo. Estos estudios preliminares no mostraron evidencia de hidrólisis por lo que se continuó con los ensayos de fotólisis directa y fotocátalisis en agua ultra pura y agua proveniente de cultivos de arroz a diferente pH (4 y 8), con el fin de evaluar diferentes condiciones ambientales.

La velocidad de degradación y los productos de transformación (PTs) detectados de forma preliminar a pH 4 y 8 fueron muy similares, por lo que en este trabajo de tesis se presentan los resultados a pH 8 que es el pH propio del agua de cultivos de arroz utilizada.

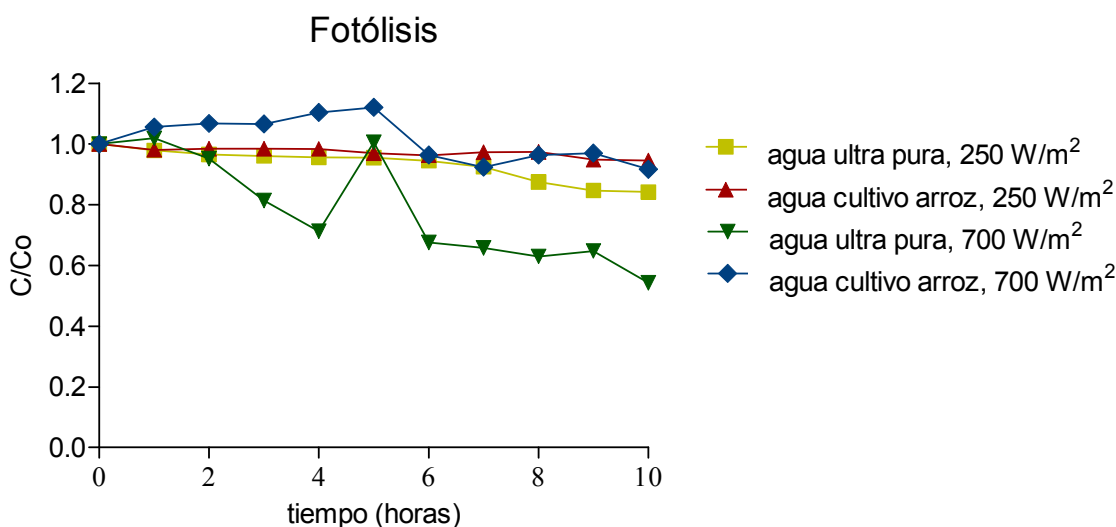
20.1.1. *Fotólisis directa de quinclorac*

Para el estudio de la fotólisis se utilizó una concentración inicial de QNC de 5 mg/L. Este valor de concentración de partida puede resultar elevado si se consideran las concentraciones reportadas para ambientes donde este compuesto ha sido detectado, sin embargo, el principal objetivo de este estudio

es identificar los productos de foto-transformación que generalmente se producen a muy baja concentración, por lo que la concentración de QNC utilizada está justificada.

El ensayo fue realizado en un simulador solar con las condiciones de operación descritas en la sección 15. La intensidad de radiación total de 250 W/m^2 utilizada inicialmente, en términos prácticos equivale a la radiación de un día con nubes, o bien a la radiación de las primeras horas de la mañana o la tarde en un día soleado en el Mediterráneo, o a las horas centrales de un día soleado en latitudes elevadas. La elección fue un intento de reproducir condiciones climáticas habituales pero no muy favorables.

Los ensayos de fotólisis se desarrollaron en el simulador solar (Suntest CPS+) exponiendo las disoluciones de QNC por un periodo de tiempo de 10 horas, tomando muestras a distintos intervalos de tiempo (1 h) para cada experimento. Luego de 10 horas de irradiación a 250, se observó una degradación del 26% en agua ultra pura. Mientras que en las mismas condiciones experimentales, la concentración de quinclorac permaneció prácticamente constante en agua de cultivos de arroz. Por lo que se decidió usar la intensidad más elevada, 700 W/m^2 , observándose una disminución del 54% en agua ultra pura pero en agua de cultivos de arroz la concentración del QNC permaneció estable. (**Figura 70 a)**



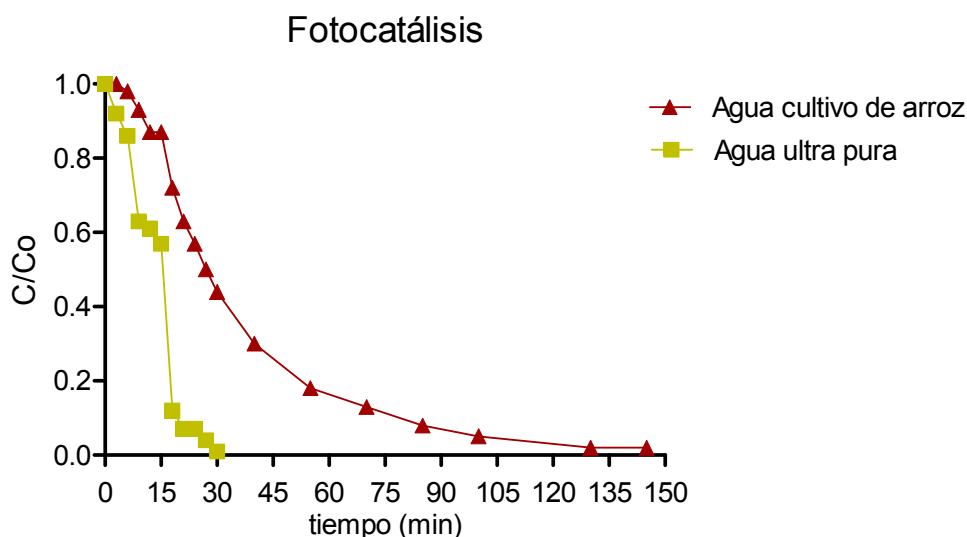


Figura 70 a. Evolución del quinclorac en condiciones de fotólisis directa para 2 sistemas acuosos; agua de cultivos de arroz y agua ultra pura en diferentes condiciones de intensidad. **b.** Evolución del quinclorac en condiciones de fotocatálisis con TiO_2 para 2 sistemas acuosos; a 250 W/m^2 .

Estos resultados indican que este herbicida es estable a la fotólisis, lo que concuerda con la literatura, que clasifica al quinclorac como persistente desde el punto de vista medioambiental. Estos resultados sugieren que su disipación depende mayoritariamente de factores biológicos y no de factores abióticos como la incidencia de la luz solar o la hidrólisis entre otros.

20.1.2. Fotocatálisis del quinclorac

Los experimentos de fotocatálisis fueron desarrollados en un simulador solar a 250 W/m^2 (mínima potencia) en soluciones acuosas de QNC a 5 mg/L y utilizando una concentración de catalizador TiO_2 P25-Degussa de 200 mg/L en todos los ensayos. A esta intensidad los tiempos de degradación fueron relativamente cortos, sugiriendo que a intensidades mayores los intermediados generados podían sufrir una rápida degradación dificultando su detección.

Bajo estas condiciones el herbicida en estudio mostró una completa degradación, luego de 40 minutos en agua ultra pura y luego de 130 min en agua de cultivos de arroz. (**Figura 70 b**)

A partir de los gráficos se puede observar que la degradación de QNC en agua ultra pura fue más rápida que en agua de cultivos de arroz. Esto sugiere una competencia entre el herbicida y los co-solutos que se encuentran disueltos o los coloides (materia orgánica) que se encuentran suspendidos en el agua de los cultivos de arroz por los radicales $\text{OH}^\bullet$. Un comportamiento similar para el herbicida clomazone en agua de cultivos de arroz fue reportado en el año 2008 por Zanella et al.⁽²⁸²⁾ En este caso los autores sugieren que este fenómeno puede deberse a que la turbidez que presenta este tipo de agua disminuye la penetración de la radiación UV.

20.2. Identificación de los Productos de Transformación de Quinclorac

Durante los procesos de fotólisis y fotocátalisis al cual fue sometido el compuesto en estudio se pudo observar la formación de varios PTs. La identificación de estos compuestos intermedios es muy importante no sólo para evaluar la eficiencia del tratamiento fotolítico o fotocatalítico sino también para la predicción del impacto ambiental del compuesto original.

Como se explicó en la sección 15, durante cada tratamiento de irradiación se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de iluminación con el fin de elucidar los PTs formados en ambos sistemas acuosos. Para asegurar la detección de los productos formados, en caso de que estuvieran presentes en muy baja concentración, estas alícuotas fueron pre-concentradas en cartuchos de SPE. Inicialmente estos análisis se realizaron en un analizador TOF simple, pero prácticamente no se observó fragmentación ni para el quinclorac ni para sus PTs por lo que fue necesario re-analizar las muestras haciendo experimentos mediante LC-QTOF-MS/MS en modo ESI positivo.

La observación detallada de los cromatogramas obtenidos durante el análisis de cada una de las alícuotas de muestra evaluadas, permitió identificar 14 PTs del QNC durante el proceso de fotocátalisis en agua ultra pura. La **Tabla 53** presenta las medidas de masa exacta, del ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de los Pts empleados para la identificación, determinadas por el QTOF y calculadas por el software descrito en la sección 10.5.5. También se muestra, el tiempo de retención, la fórmula empírica propuesta, el m/z , el error entre ambas y el DBE (del inglés

Double Bond and Ring Equivalent). Este último es un parámetro que representa el número de anillos y dobles enlaces presentes en la molécula.

Compuesto	t_R (min)	Fórmula	m/z		Error (ppm)	DBE
			Experimental	Teórico		
QNC	7,6	$C_{10}H_6Cl_2NO_2$	241,9768	241,9770	1,08	7,5
P1*	5,7	$C_{10}H_7ClNO_3$	224,0103	224,0109	12,02	7,5
P2	6,2	$C_{10}H_6Cl_2NO_3$	257,9704	257,9719	3,02	7,5
P3	4,0	$C_{10}H_6Cl_2NO_3$	257,9711	257,9719	4,8	7,5
P4*	7,3	$C_{10}H_6Cl_2NO_3$	257,9707	257,9719	4,42	7,5
P5	6,1	$C_{10}H_6Cl_2NO_4$	273,9680	273,9668	-2,23	7,5
P6	4,4	$C_{10}H_6Cl_2NO_4$	273,9675	273,9668	0,12	7,5
P7	2,0	$C_{10}H_6Cl_2NO_5$	289,9619	289,9618	-0,20	7,5
P8	6,9	$C_{10}H_6Cl_2NO_3$	257,9716	257,9719	1,43	7,5
P9	2,4	$C_{10}H_8Cl_2NO_4$	275,9822	275,9825	0,94	6,5
P10	3,3	$C_{10}H_8Cl_2NO_5$	291,9780	291,9774	0,94	6,5
P11	6,7	$C_9H_9ClNO_4$	230,0216	230,0215	-0,7	5,5
P12	5,4	$C_9H_8ClNO_2$	216,0036	216,0058	9,89	5,5
P13	3,5	$C_8H_7ClNO_5$	232,0008	232,0007	-0,17	5,5
P14*	3,5	$C_8H_7ClNO_2$	184,0158	184,0160	0,99	5,5

Tabla 53. Composición elemental, masa exacta y tiempo de retención del QNC y sus PTs obtenidos durante los procesos de fotocatalisis y fotólisis y mediante LC-QTOF-MS/MS. *PTs identificados durante los experimentos de fotólisis.

En la mayoría de los casos se obtuvo una muy buena concordancia entre las medidas de masa exacta experimentales y las formulas propuestas (< 5 ppm de error), lo cual confiere una elevada confianza a la identificación. La propuesta de estructuras químicas fue posible tomando como base el conocimiento previo de la molécula precursora y la composición elemental obtenida para las moléculas protonadas y sus iones fragmento característicos junto con la información adicional de los valores de DBE. Este un parámetro de gran ayuda en la asignación de estructuras, proporcionando una confirmación adicional de la estructura molecular propuesta.

El punto de partida para facilitar la identificación de PTs consiste en la observación del espectro de masas del compuesto de partida, ya que pérdidas, patrones isotópicos o fragmentos característicos pueden repetirse en los PT generados, facilitando el reconocimiento de los mismos y su identificación. En este trabajo el patrón isotópico del Cl presente tanto en el ión precursor como en los iones fragmento fue muy importante para la identificación de los PTs.

Para esto, en cada experimento de MS/MS realizado, se utilizaron ventanas de tiempo de tiempo de $\Delta m/z = 4$ para el ión precursor, de forma de incluir al patrón isotópico del Cl en los espectros.

En general, los principales iones productos encontrados en los espectros del QNC y de sus PTs se asociaron con pérdidas neutras de agua ($[M+H-18]^+$) seguidas por pérdidas de monóxido de carbono $[M+H-18-28]^+$. Estas pérdidas no específicas son características de compuestos aromáticos que poseen un grupo carboxilo (COOH) con un hidrógeno en posición α , y lleva aparejado un incremento del DBE en una unidad mediante la formación de un anillo. La presencia de estas pérdidas en los espectros de masa de los PT puede indicar la persistencia de este grupo carboxilo en sus estructuras.

En el análisis inicial de las muestras se utilizó un voltaje de fragmentación en la fuente de 90 y 190 V según el caso. Estos voltajes fueron adecuados para garantizar la observación del ion molecular de los PT generados, imprescindible para su correcta identificación. Además se utilizaron diferentes energías de colisión, en el rango 5-30 eV. Trabajar con diferentes energías de colisión permite obtener mayor información estructural a la hora de elucidar los diferentes PT. Ésta es una posibilidad que ofrece el equipo y que permite incrementar o disminuir la fragmentación, facilitando la elucidación estructural de los intermedios desconocidos, tal como se muestra en la **Figura 71** para el compuesto P1.

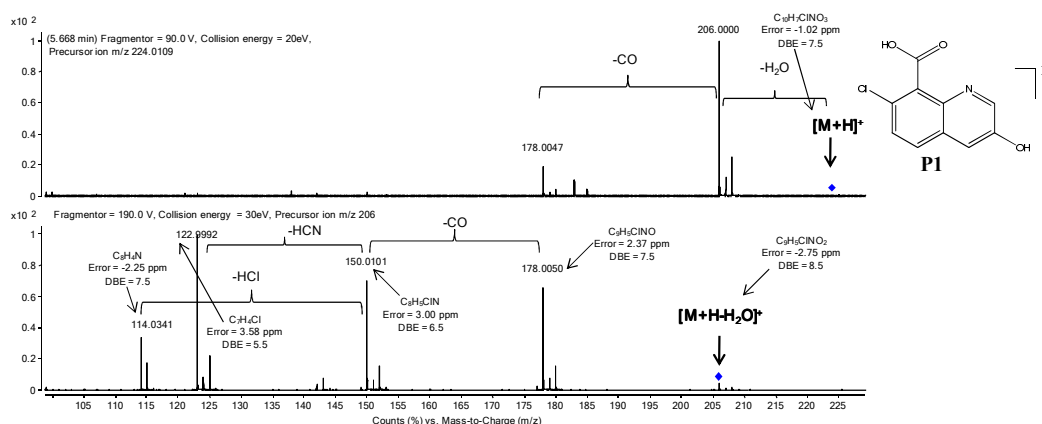


Figura 71. Elucidación estructural mediante masa exacta del P1.

De esta forma a partir de todos los espectros de masa de los diferentes PTs generados durante la fotocatalisis del QNC en agua ultra pura, se logró la detección e identificación de 14 PTs (nombrados desde P1 a P14). (**Figura 72**) Durante la fotólisis del agua ultra pura se detectaron P1, P3, P4, P9 y P14, mientras que en agua de cultivos de arroz, sólo se encontraron los compuestos identificados como P4 y P14.

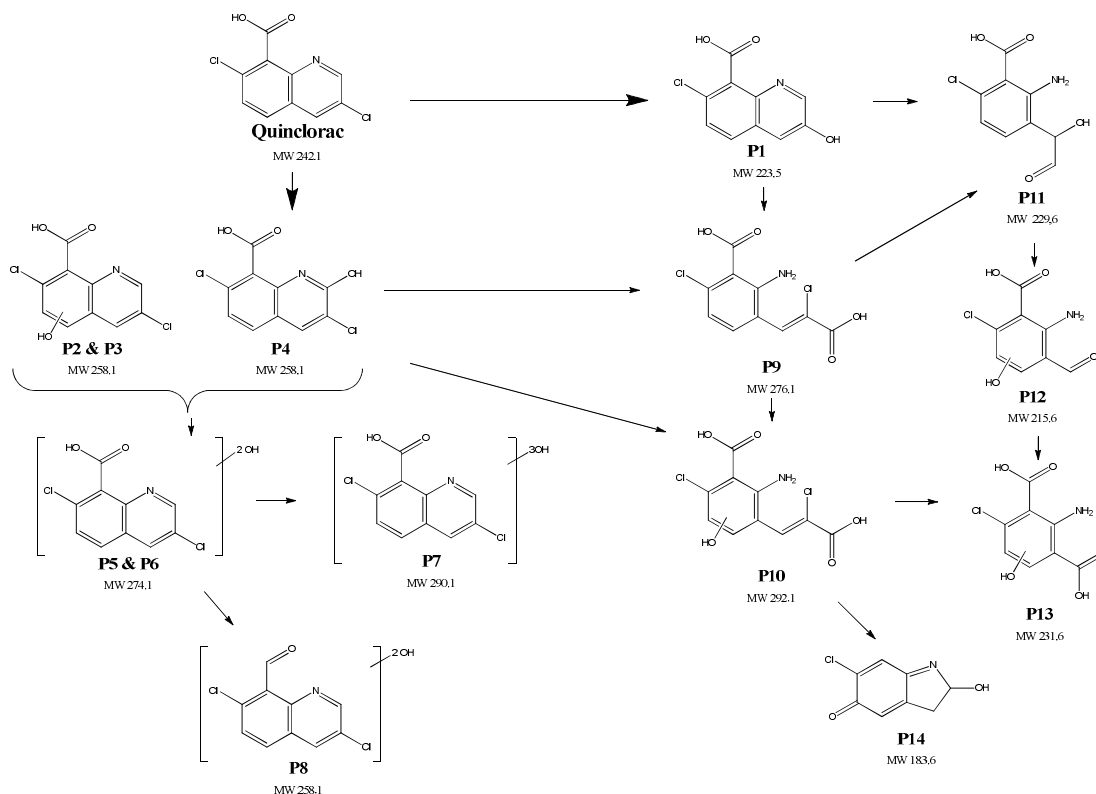


Figura 72. Ruta de degradación del QNC durante la fotocatalisis en agua ultra pura.

El espectro obtenido mediante LC-QTOF-MS/MS del QNC se presenta a continuación.

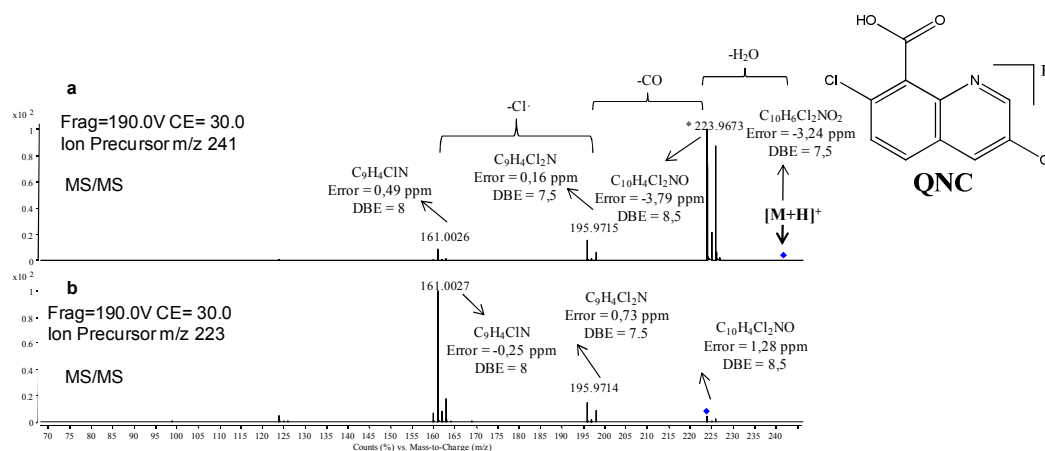


Figura 73 a y b. Espectro de masa exacta del QNC y su patrón de fragmentación obtenido mediante LC-QTOF-MS/MS.

En la **Figura 73 a**, se puede observar que el ión precursor sufre una pérdida de agua, seguida por una pérdida de CO. Por otro lado, un aumento de la CE genera iones “odd electron” por la pérdida del $\text{Cl}^\bullet$ (m/z 161).

Experimentos adicionales fueron realizados utilizando como ión precursor el ión fragmento $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, sin conseguir información adicional, **Figura 73 b**.

A partir de los PTs identificados durante el tratamiento fotocatalítico la ruta de transformación puede ser explicada por varios mecanismos de degradación que ocurren simultáneamente. Una de ellos es a través de la declorinación oxidativa, iniciada por el intermediario P1 ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClNO}_3$; DBE: 7,5; t_R : 5,7 min).

Al comienzo de los análisis los experimentos realizados mediante CID (del inglés Collision-Induced Dissociation), es decir seleccionando $[\text{M}+\text{H}]^+$ como ión precursor y realizando la fragmentación, mostraban solamente las pérdidas neutras de $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}$. Posteriormente se seleccionó el ión fragmento $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ como ión precursor obteniéndose, en algunos casos, nuevos fragmentos, como se observa en la **Figura 71**. En este caso se pudo observar la pérdida adicional de CO (m/z 150) mediante un rearrreglo típico de los alcoholes aromáticos con la subsecuente pérdida de HCN (m/z 123) y HCl (m/z 114). La composición elemental del fragmento de m/z 123 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{Cl}$; DBE: 5,5) sugiere que la pérdida de Cl (HCl) ocurre en el anillo piridínico, soportando la estructura propuesta.

Por otro lado, con la ayuda de una herramienta informática (ChemBio3D Ultra software, v12, CambridgeSoft 2009, Clog P driver tool) se calculó el log K_{ow} de los PTs para estimar el tiempo de elución en una columna cromatográfica de fase reversa. Para el P1, propuesto como el producto de transformación mono hidroxilado, el log K_{ow} fue 2,56, mientras que para la otra posible estructura de sustitución de Cl por OH el log K_{ow} fue 3,58. Esta diferencia entre el log K_{ow} para ambas moléculas se explica por un aumento en la lipofilia de la molécula por la formación de enlaces de H intramoleculares entre el OH y el COOH. El log K_{ow} estimado para el QNC fue 2,98 y su t_R fue 7,6 min, por lo que a partir de los valores de log K_{ow} del QNC y de P1 se esperaba un tiempo de elución menor para P1; lo cual fue confirmado experimentalmente ya que el compuesto P1 presentó un t_R de 5,7 min.

La segunda ruta de transformación ocurre mediante reacciones de hidroxilación en diferentes partes de la molécula de QNC producidas por $OH^\bullet$. Como resultado de estas reacciones se genera un grupo de 4 compuestos isobáricos (compuestos de igual masa exacta) identificados como P2, P3, P4 y P8 con masa nominal m/z 258 ($C_{10}H_6Cl_2NO_3$; DBE: 7,5), P2-P4 pueden corresponder a derivados mono hidroxilados mientras que P8 podría ser un derivado dihidroxilado reducido. La diferenciación de estos isómeros no es sencilla mediante análisis de MS porque en la mayoría de los casos sus espectros de masas son idénticos. Sin embargo en este caso se observaron importantes diferencias. De este grupo de compuestos solamente P2, P3 y P4 mostraron la misma pérdida secuencial de $H_2O + CO$ que el QNC y P1, característica de los compuestos que poseen un grupo funcional COOH (**Figura 74**). Por otro lado los compuestos P2 y P3 mostraron el mismo patrón de fragmentación, sugiriendo que el grupo -OH podría ocupar posiciones equivalentes en la molécula de QNC pero lamentablemente no pudo asignarse con exactitud dicha posición de hidroxilación mediante la técnica propuesta.

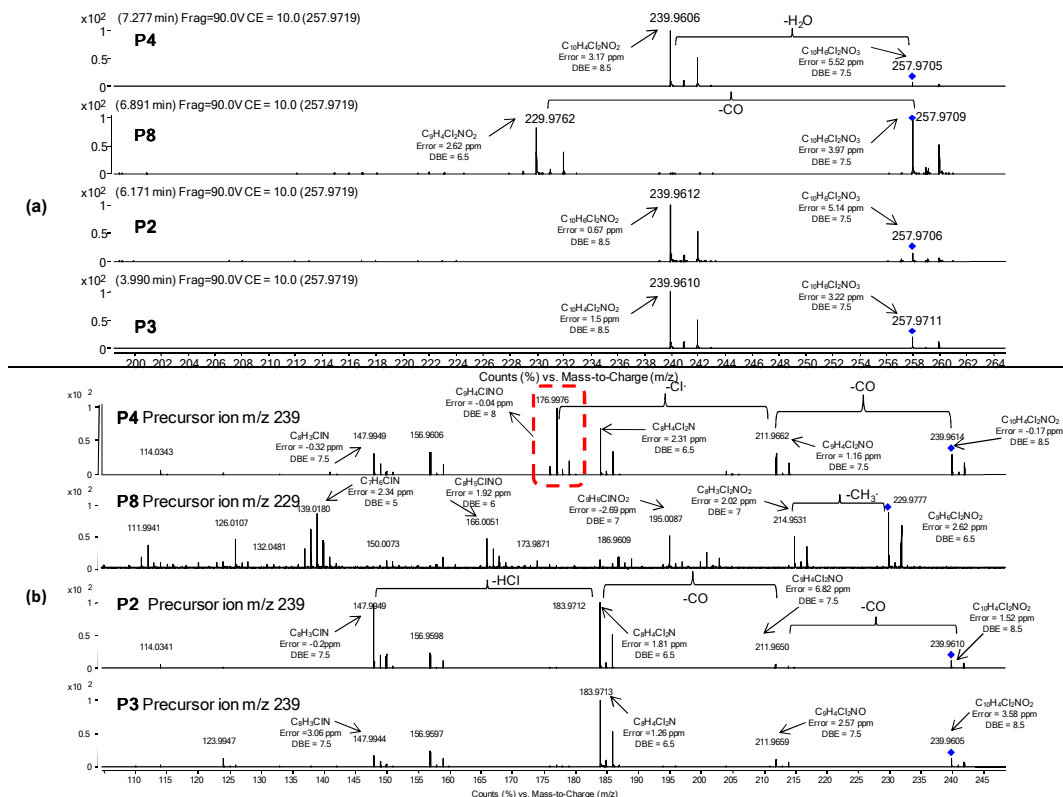


Figura 74. Fragmentación característica de los PTs isobáricos (m/z 258); P2, P3, P4 y P8 en experimentos de **a.** MS y **b.** MS/MS.

En cambio, el compuesto P4 (t_R : 7,3 min) presentó un comportamiento diferente, fue el isómero más abundante obtenido en fotocatalisis, independientemente del tiempo de reacción y el que presentó mayor tiempo retención en la columna cromatográfica como se muestra en la **Figura 75**.

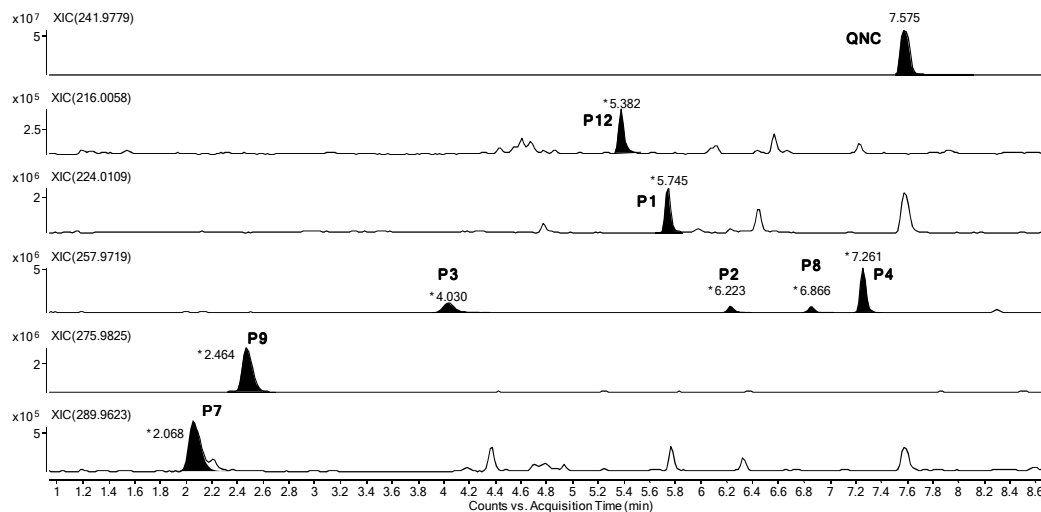


Figura 75. Cromatograma de iones extraídos (XIC) del QNC y algunos de los PT obtenidos: P1-P4, P7-P9 y P12.

Es de esperar que el ataque de los $\text{OH}^\bullet$ ocurra en las posiciones más susceptibles (ej. posiciones con alta densidad de carga) por lo que se propone la estructura de P4 como se muestra en la **Figura 72**. Posteriormente se realizaron experimentos MS/MS seleccionando como ion precursor el ión m/z 239 (formula $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{NO}$) para los compuestos P2, P3 y P4, donde se pudo constatar que sólo P4 sufre una pérdida de $\text{Cl}^\bullet$ para el ión m/z 211 (formula $\text{C}_9\text{H}_4\text{Cl}_2\text{NO}$, **Figura 74 b**). Esta evidencia explica la hidroxilación en la porción piridínica de la molécula de QNC en lugar de la hidroxilación en la porción correspondiente al ácido benzoico, como fue propuesto para los otros dos productos mono hidroxilados P2 y P3. La estructura propuesta para P4 está basada en el aumento de la densidad electrónica en la posición α al átomo de N en comparación con la posición γ .

Los compuestos marcados como P5, P6 y P7 son producto de las subsiguientes di y tri-hidroxilaciones de la molécula de QNC. Estas reacciones ocurren generalmente en tratamientos fotocatalíticos, siendo en este caso relevante la formación del compuesto P4 en agua ultra pura (**Figura 82**). El PT P8 (t_R : 6,891 min) mostró una única pérdida de CO, que fue seguida por la pérdida de $\text{CH}_3^\bullet$, $\text{Cl}^\bullet$ y 2 pérdidas consecutivas de CO bajo condiciones de fragmentación elevadas (**Figura 74 b**). Este patrón de fragmentación se explica por la formación de derivados di hidroxilados con la consiguiente reducción del grupo $-\text{COOH}$ a aldehído ($-\text{COH}$) como se propone en la estructura de P8.

La molécula protonada del P9, (t_R : 2,44 min), de masa nominal m/z 276 y fórmula empírica $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{NO}_4$ presentó un menor DBE (6,5) que el QNC (DBE: 7,5). La estructura fue asignada en base a su espectro de masa exacta que evidencia la apertura del anillo piridínico mediante ruptura oxidativa del enlace $\text{C}=\text{N}$, en concordancia con la estructura sugerida (**Figura 76**). Además dos pérdidas neutras sucesivas de $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}$ confirman la presencia de 2 grupos carboxílicos terminales, como se propone para este PT. Por otro lado, este compuesto juega un rol importante en la evolución de los PTs en los pasos finales de la ruta de degradación propuesta, ya que P10 y P11 son producto de distintas oxidaciones de P9, la primera ocurriendo en la porción “benzoica” de la molécula y mientras que la segunda en la porción alifática.

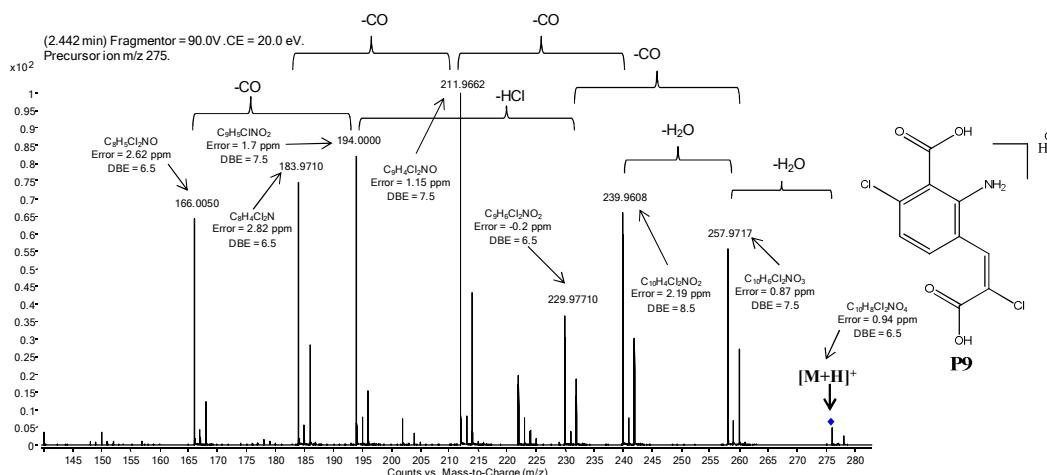


Figura 76. Elucidación estructural del PT P9 mediante masa exacta.

El producto identificado como P10 se asume como el producto formado a partir de la hidroxilación de P9 en el anillo aromático, confirmado por una pérdida adicional de CO correspondiente a la estructura fenólica que genera un compuesto de masa nominal m/z 138 (**Figura 77**).

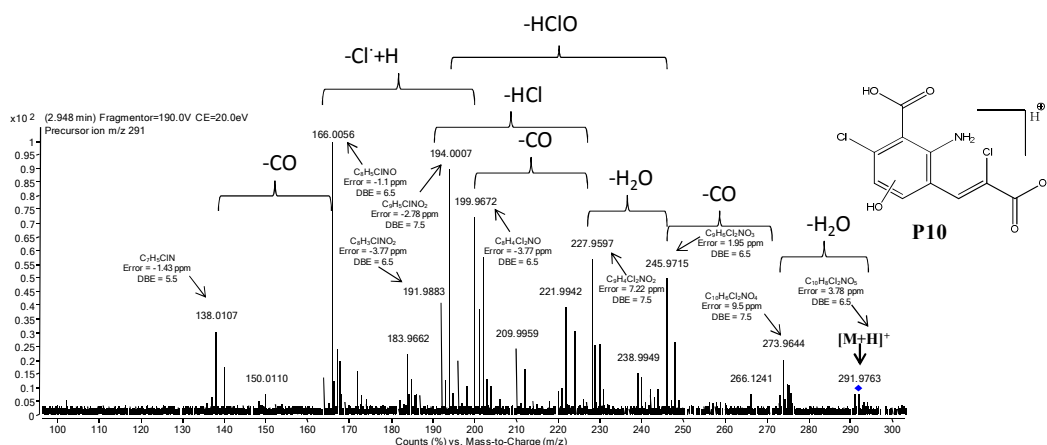


Figura 77. Elucidación estructural del PT P10 mediante masa exacta.

Los experimentos de MS/MS realizados al compuesto $[P11+H]^+$; indicaron la existencia de una pérdida de $H_2O + CO$, lo que indica la presencia de un grupo carboxílico, mientras que las subsiguientes pérdidas neutras de CH_2O seguida de CO, sugieren la presencia de un aldehído terminal concordante con la estructura propuesta en la **Figura 77**. Basado en estas evidencias, el compuesto P11 puede ser producido luego de la sustitución oxidativa del Cl y la

descarboxilación de la cadena alifática de P9. El espectro de masa obtenido para el compuesto P12, revela la pérdida de $\text{H}_2\text{O} + 2 \text{CO}$ lo que concuerda con la estructura propuesta de aldehído mono hidroxilado (**Figura 79**).

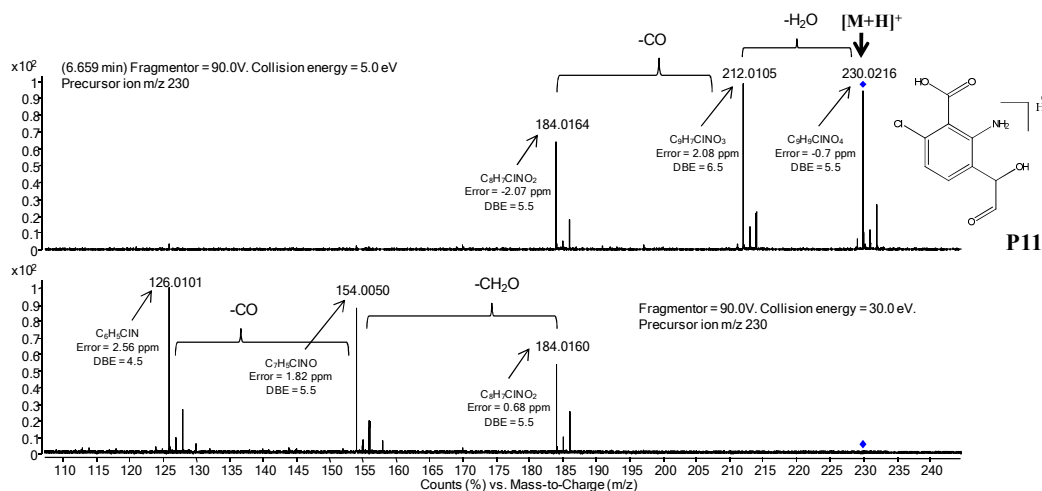


Figura 78. Elucidación estructural del PT P11 mediante masa exacta.

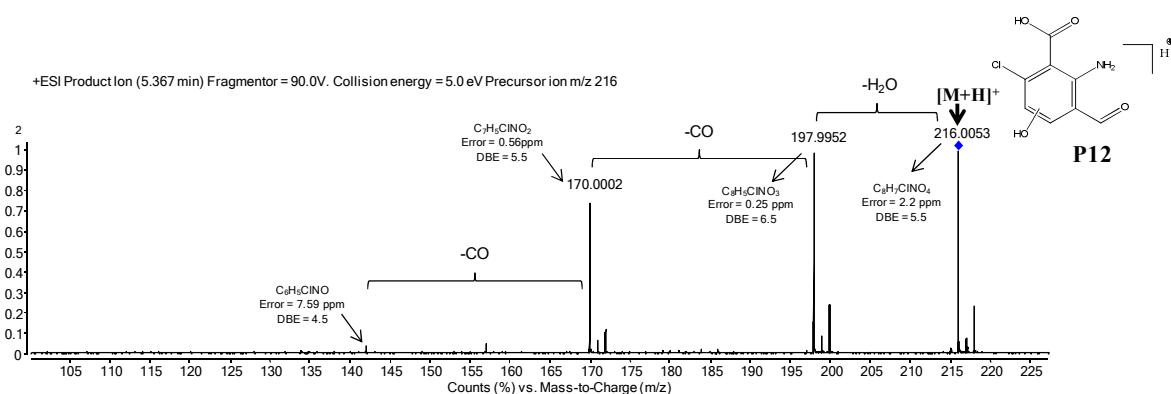


Figura 79. Elucidación estructural del PT P12 mediante masa exacta.

El P13 (formula $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClINO}_5$; DBE: 5,5) se asignó como un ácido di-carboxílico mono hidroxilado. Esta estructura concuerda con 2 pérdidas de $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}$ y con una pérdida final de CO (**Figura 80**). Finalmente la estructura asignada en la **Figura 81** es el compuesto P14. En este caso el ión precursor pierde etenona ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$) (formula $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClINO}_2$; DBE: 5,5) para dar un fragmento de masa nominal m/z 142, (formula $\text{C}_6\text{H}_5\text{ClINO}$; DBE: 4,5) que posteriormente pierde un CO para dar un nuevo ión fragmento de m/z 114, mostrando un patrón de fragmentación diferente al resto de los compuestos. El ión m/z 142 y

la pérdida de CO sugieren que el oxígeno no pertenece al CO₂ como se propuso anteriormente. Por lo que se asume que la pérdida de H₂O que origina el ión m/z 166 (formula C₈H₅ClNO; DBE: 6,5), pertenece al aldehído terminal como se observa en la estructura propuesta, mientras que el otro oxígeno está localizado en la posición *-para-* con respecto al N formando una quinona. La descarboxilación del ácido benzoico continúa con la adición de un OH• al carbono α, deficiente en electrones, por estar unido a un Cl, y que termina en una ruptura del enlace mediante un mecanismo de Norrish tipo I y descarboxilación para dar un aldehído que se condensa para formar el compuesto cíclico.

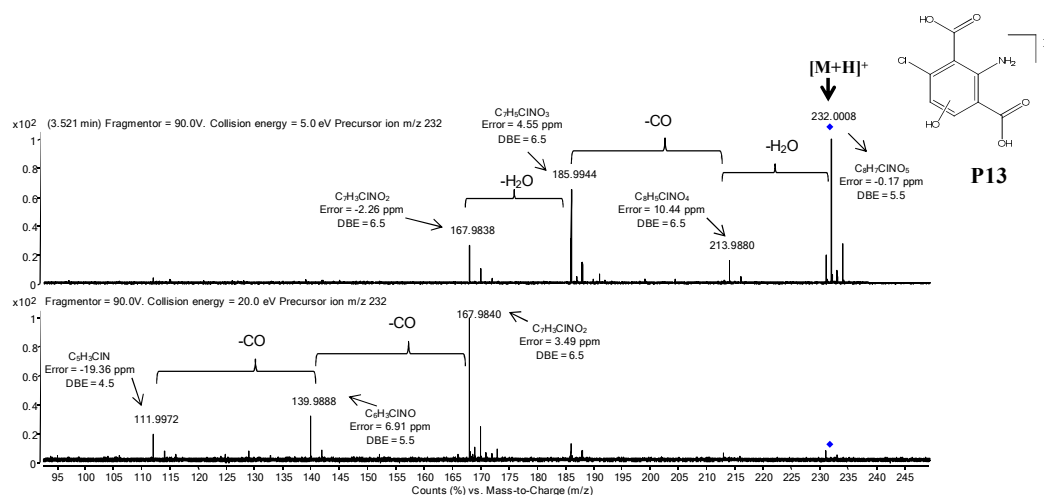


Figura 80. Elucidación estructural del PT P13 mediante masa exacta.

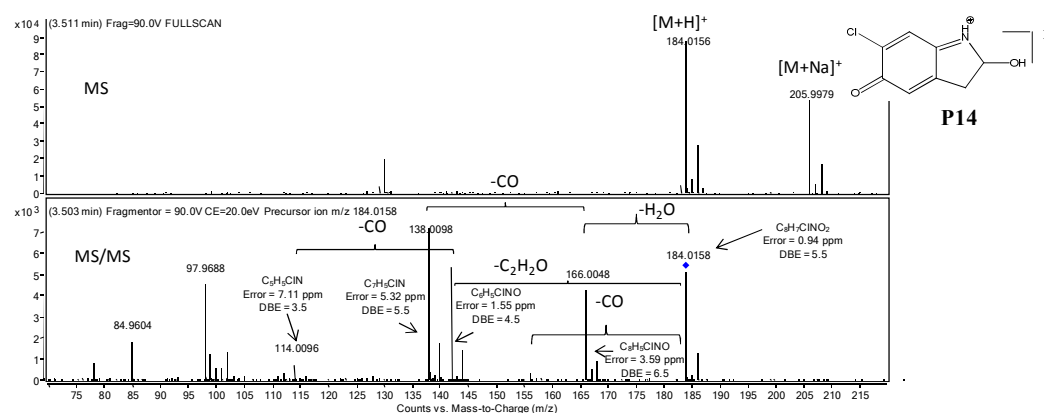


Figura 81. Elucidación estructural del PT P14 mediante masa exacta.

20.3. Ruta de degradación del quinclorac y evolución de los intermediarios de reacción

Como se mencionó anteriormente, a partir de los productos de transformación del quinclorac identificados se propone la ruta de degradación que fue presentada en la **Figura 72**. La evolución de los intermediarios generados en los procesos de fotólisis y fotocátalisis durante el tiempo de reacción en ambas matrices se presenta en las **Figura 82 y 83**, respectivamente.

20.3.1. Fotólisis

Para estudiar la evolución de los intermediarios de reacción durante las 10 horas de iluminación transcurridas se tomaron alícuotas de 1 mL en intervalos de 1 h las cuales fueron analizadas mediante LC-QTOF-MS/MS. En este período solo fueron detectados e identificados, por encima del LOD del instrumento, 5 compuestos en agua ultra pura (P1, P3, P4, P9 y P14) y 2 compuestos (P4 y P14) en agua de cultivos de arroz, tal como se muestra en la **Figura 82**. Por otro lado, en agua ultra pura, los compuestos P4 y P14 presentaron la mayor abundancia. Ambos compuestos presentan un comportamiento diferente, P4 aumenta hasta las 8 horas de iluminación en donde su concentración es máxima para luego comenzar a decaer; en cambio la concentración de P14, último intermediario detectado en la ruta de degradación propuesta aumenta continuamente (**Figura 82 a**). Durante la fotólisis en agua de arroz se observa que la concentración de P4 es constante a lo largo del tiempo, mientras P14 presenta el mismo comportamiento que en agua ultra pura, aumenta proporcionalmente con el tiempo de reacción (**Figura 82 b**).

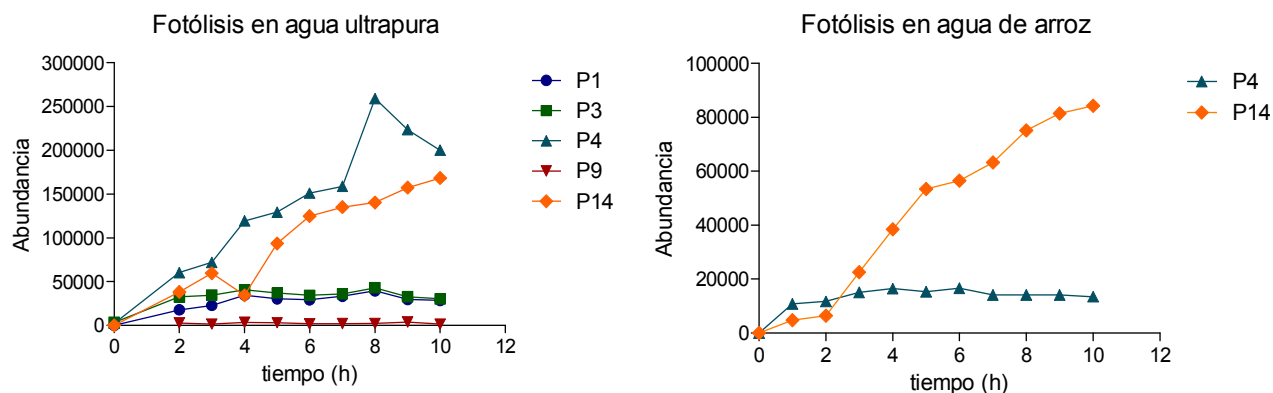


Figura 82. Evolución de los PT obtenidos en agua ultra pura (a) y agua de cultivos de arroz (b) mediante fotólisis.

Debido a la diferencia en cuanto a la presencia y comportamiento de los intermediarios detectados en ambas matrices, se podría decir que en agua ultra pura ocurre un proceso de fotólisis directa (**Figura 82 a**) mientras que en agua de cultivos de arroz podría existir un fenómeno de fotólisis indirecta (**Figura 82 b**). Cabe destacar que P1 no fue detectado en agua de cultivos de arroz. Sin embargo, dado que la abundancia de los PTs presentes en el agua ultra pura es casi tres veces mayor que en el agua de cultivos de arroz y que la tasa de degradación del QNC en el agua proveniente de campos de arroz es más lenta (**Figura 70 a**), la contribución total de la fotólisis indirecta en periodos breves parecería ser insignificante.

20.3.2. Fotocatálisis

Para estudiar la evolución de los intermediarios de reacción durante el proceso de fotocatálisis se tomaron alícuotas de 1 mL cada 3 min para ambas matrices estudiadas hasta los 30 min y a partir de este tiempo las alícuotas fueron tomadas cada 15 min para agua de cultivos de arroz y una única alícuota a los 40 min para agua ultra pura, dichas alícuotas fueron filtradas mediante filtros de 0,45 μm para eliminar posibles restos de catalizador y posteriormente analizadas mediante LC-QTOF-MS/MS. Los tiempos de irradiación en este caso fueron diferentes para ambos sistemas acuosos; para agua ultra pura a

los 40 min de iluminación se observó prácticamente la remoción total del QNC mientras que en agua de cultivos de arroz el tiempo fue de 145 min.

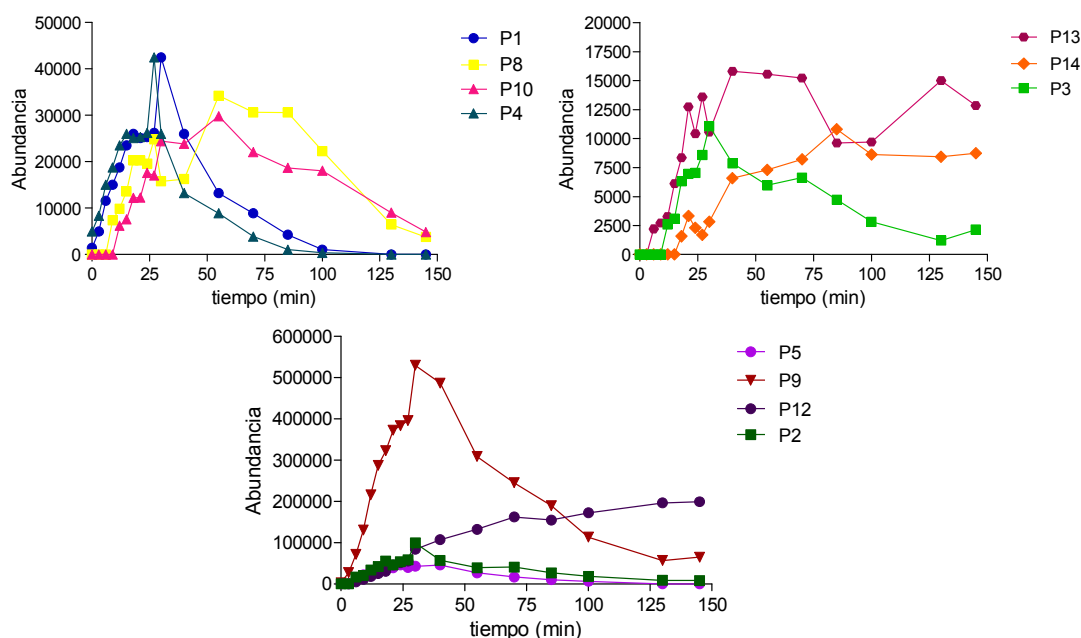


Figura 83. Evolución de los principales intermediarios detectados durante el proceso fotocatalítico en agua de cultivos de arroz.

Como se puede observar en la **Figura 83**, no existe una tendencia general para todos los intermediarios detectados; algunos compuestos (P1-P5, P8-P10), muestran un comportamiento de aparición/desaparición, mientras que otros, como el P12, aumentan con el tiempo y para otros su concentración va aumentando hasta un tiempo en el cual su concentración permanece inalterada (P13 y P14). Los compuestos mayoritarios en este experimento fueron P9 y P12 y seguidos por P1, P2, P4, P5 y P9. Esto corrobora la hidroxilación que se produce en la posición C9 seguida de la apertura del anillo piridínico como uno de los pasos clave de la evolución de la degradación fotocatalítica del QNC. Por otro lado la sustitución del Cl por OH, en el anillo piridínico se confirma también por la identificación de P1 en este medio de reacción. La hidroxilación siguiente en la posición C9 podría sugerir una relación entre ambas vías de degradación (la declorinación oxidativa del Cl y la hidroxilación del núcleo piridinico) vía formación de P9. A partir de la ruta de transformación propuesta en la **Figura 72** y de la presencia de P1 y P4 en los primeros minutos del tratamiento se podría decir que el $\text{OH}^\bullet$ reacciona principalmente en dos sitios

específicos de la molécula de QNC dando lugar a las dos vías transformación observadas (declorinación oxidativa e hidroxilación)

Luego de 145 min de irradiación del agua de cultivos de arroz se observa una mineralización parcial, debido a la presencia de P9 y P12.

Como se puede observar en la **Figura 84**, la producción de P9 es casi 10 veces menor en agua ultra pura que en agua de cultivos de arroz, **Figura 83**.

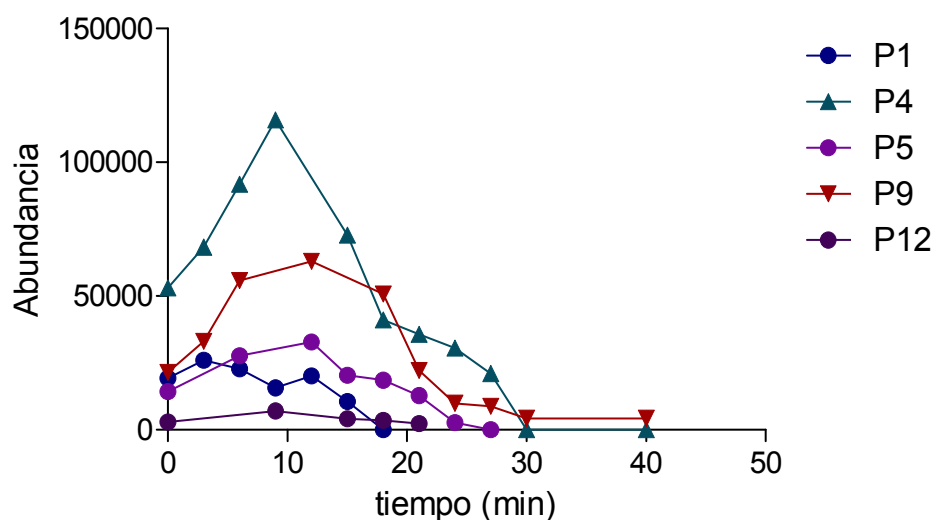


Figura 84. Evolución de los principales intermediarios detectados durante el proceso fotocatalítico en agua ultra pura.

Los compuestos P1, P4 y P14 fueron detectados en ambos experimentos; fotólisis directa y fotocátalisis. A pesar de que P14 se mantuvo más estable durante la degradación fotolítica.

En general la abundancia de los productos de transformación del QNC durante la fotocátalisis es mucho mayor en el agua de arroz que en agua ultra pura. Una posible explicación de la diferencia en las abundancias de una matriz y otra podría ser que en el agua de cultivos de arroz, la turbidez del medio de reacción retarda el proceso y a su vez podría disminuir la energía total transmitida aumentando la vida media de los PTs. Por otro lado en las condiciones del proceso fotocatalítico, se podrían generar a partir de la materia orgánica algunos intermediarios reactivos, que podrían reaccionar a su vez con el quincolorac para obtener PTs aumentando la concentración con respecto al agua ultra pura.

Desde un punto de vista ambiental a futuro sería relevante estudiar la toxicidad de los productos de transformación generados en el medio acuático.

20.4. Conclusiones parciales de la aplicación de procesos de oxidación avanzada para la degradación del quinclorac.

-Se evaluó la aplicación de Procesos de Oxidación Avanzada para la degradación química del herbicida quinclorac en agua ultra pura y en agua de cultivos de arroz.

-Se observó que este herbicida posee una alta persistencia en agua de cultivos de arroz, debido a la ausencia de hidrólisis y su estabilidad bajo condiciones de fotólisis.

-La fotocatalisis heterogénea degradó prácticamente 100% de este herbicida en ambos sistemas acuosos, siendo los tiempos de degradación de 40 min para agua ultra pura u 145 min para agua de cultivos de arroz.

-Los análisis realizados mediante LC–QTOF–MS/MS permitieron sugerir la producción de varios productos de transformación del quinclorac y postular posible ruta de degradación.

-Los resultados muestran que algunos de los productos de transformación obtenidos con los procesos de foto-degradación estudiados son los mismos.

-A futuro, es necesario realizar un estudio de la toxicidad de los productos de transformación mayoritarios con el fin de evaluar la aplicación de la fotocatalisis en aguas provenientes de la agricultura y otros sistemas acuosos.

21. Conclusiones generales

Se desarrollaron y validaron metodologías de análisis multi-residuo para la determinación de 9 herbicidas de post-emergencia en suelo, agua y grano de arroz utilizando diferentes condiciones de extracción y clean-up y el mismo método cromatográfico mediante LC-DAD.

El trabajo se desarrolló en etapas que fueron aumentando el número de pesticidas evaluados así como la simplicidad de los tratamientos de muestra y la sensibilidad de detección de los residuos a evaluar.

Se utilizaron métodos instrumentales modernos LC-QqQ/MS y LC-QLIT/MS para aumentar el número de analitos evaluados en agua y grano de arroz, con el fin de cubrir el máximo número de pesticidas que se utilizan en cultivos de arroz a nivel mundial.

En agua, las metodologías desarrolladas permitieron analizar 48 residuos de pesticidas mediante LC-QqQ/MS por SPE y 70 compuestos mediante LC-QLIT/MS por inyección directa en columna. La principal ventaja que presentan es que pueden ser fácilmente extrapolables a otros sistemas acuosos.

En arroz se compararon y finalmente se validaron diferentes metodologías de extracción y clean-up basadas en el método de QuEChERS. El número máximo de compuestos analizados en arroz blanco mediante LC-QqQ/MS fue 33 y 42 en arroz paddy.

Los resultados obtenidos demuestran que no existe un método de análisis universal para la determinación de residuos de pesticidas en grano de arroz, por lo que es necesaria la evaluación del tipo de pesticidas y de la composición de la matriz a la hora de definir el método más apropiado para cada situación.

La aplicación de las metodologías desarrolladas permitió obtener datos acerca de la presencia de agroquímicos en cultivos de arroz en nuestro país, detectándose algunos pesticidas; propanil, clomazone, quinclorac y

tebuconazol en muestras ambientales y tebuconazol, imidacloprid y difenoconazol en el grano.

En principio los datos obtenidos muestran que existe baja presencia de residuos en este ecosistema. Sin embargo para realizar un estudio de impacto ambiental se debería continuar el monitoreo de pesticidas en este cultivo para ampliar el número de muestras e incluir datos de residuos de pesticidas en organismos vivos.

Con respecto a las tolerancias máximas de pesticidas, algunas de las muestras de agua mostraron concentraciones mayores al nivel máximo permitido por la normativa de la UE de aguas, mientras que para suelo no existe aún una normativa particular.

Los residuos de pesticidas encontrados en las muestras comerciales de arroz cumplen con los LMRs establecidos por las normativas internacionales para este alimento.

El estudio de la residualidad de pesticidas en condiciones controladas a campo mostró que en principio, en las condiciones del ensayo y al tiempo en que fue realizado el estudio, los herbicidas utilizados en el experimento no generan residuos que permanezcan en el grano a los niveles de detección obtenidos con las metodologías de análisis desarrolladas.

Para el resto de los pesticidas aplicados, la tendencia observada en la concentración de residuos fue a disminuir a lo largo del proceso productivo del arroz, observándose las mayores concentraciones en arroz paddy.

Este experimento demuestra la importancia de realizar estudios de residualidad de pesticidas a lo largo de la cadena de producción, para los diferentes productos que se generan buscando avanzar en el conocimiento de su distribución y entonces poder estimar los factores de procesamiento.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo brindar herramientas analíticas objetivas para evaluar el nivel de residuos de pesticidas en diversas matrices del ecosistema del cultivo de arroz.

Los procedimientos aquí desarrollados, son un insumo importante para asegurar la calidad y seguridad alimentaria de la población así como para evaluar la sustentabilidad de los sistemas agrícolas.

Los resultados generados constituyen una herramienta analítica importante para la realización periódica del monitoreo del ecosistema de arroz, pudiendo servir como disparador para futuras evaluaciones de los diferentes sistemas agrícolas en crecimiento en nuestro país.

La degradación del Quinclorac demostró la eficacia de la fotocátalisis heterogénea, con catalizador de TiO_2 en la degradación de este herbicida en dos sistemas acuosos. La eliminación total de quinclorac, se alcanzó en periodos de tiempo cortos, de 40 minutos para agua ultra pura y de 145 min para agua de cultivos de arroz.

El empleo de la plataforma de LC-QTOF-MS/MS, permitió el estudio de la degradación del quinclorac por procesos de oxidación avanzada demostrando un alto potencial en la evaluación de compuestos desconocidos. De esta manera, fue posible identificar 14 productos de transformación durante el proceso de fotocátalisis.

Los resultados obtenidos aportan un mayor conocimiento en la evolución del quinclorac hacia productos de degradación como consecuencia de tratamientos foto catalíticos.

Para completar este estudio sería necesario estudiar la toxicidad de los productos de transformación mayoritarios con el fin de evaluar la aplicación de la fotocátalisis en aguas provenientes de la agricultura y otros sistemas acuosos.

Los procedimientos desarrollados en este trabajo tienen como objetivo contribuir a la sustentabilidad de los ecosistemas agrícolas. Para ello se buscó por un lado, desarrollar estrategias para conocer el nivel de residuos de

pesticidas en el ambiente y los alimentos que se producen y por otro, generar herramientas ambientalmente amigables, empleando energías renovables, para la remediación de cursos de agua que puedan contener herbicidas semi-persistentes como el quinclorac.

22. Bibliografía.

1. Pretty, J. Agricultural Sustainability: Concepts, Principles and Evidence. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **2008**, 363, 447-465.
2. López Pérez, M.A.; Vicente Martínez, C.; Fernández Castela, A.; Fuente Gómez, U. Agrosistemas, <http://www.ucm.es/info/ecologia/Descriptiva/Agrosistem/Resumen/RESUMEN.htm>, (4 de noviembre).
3. Edwards, C.A.; Grove, T.L.; Harwood, R.R.; Pierce, C.J. The Role of Agroecology and Integrated Farming Systems in Agricultural Sustainability. Agriculture, Ecosystems and Environment **1993**, 46, 99-121.
4. Ferrero, A.; Tinarelli, A. Rice Cultivation in the E.U Ecological Conditions and Agronomical Practices. In Pesticide Risk Assessment in Rice Paddies: Theory and Practice, Capri E.; Karpouzias, D.G.; Eds. Elsevier; Países Bajos, **2008**; pp. 1-2.
5. Descripción del arroz; <http://www.unctad.org/infocomm/espagnol/arroz/descripc.htm>, (consulta: 16 de Agosto de 2012).
6. Seguimiento del Mercado del Arroz. <http://www.fao.org/economic/est/publicaciones/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>, (consulta: 16 de Agosto de 2012).
7. Asociación de Cultivadores de Arroz, Estudio de Mercado. Revista Arroz, Asociación de Cultivadores de Arroz: Montevideo, **2011**, 66, pp. 48-50.
8. Asociación de Cultivadores de Arroz, Informe de Mercado. Revista Arroz, Asociación de Cultivadores de Arroz: Montevideo, **2011**, 68, pp. 4-8.
9. Asociación de Cultivadores de Arroz, Estudio de Mercado. Revista Arroz, Asociación de Cultivadores de Arroz: Montevideo, **2011**, 65, pp. 48-50.
10. Van Nguyen, N. Sustainable Intensification of Rice Production For Food Security in the Near Future – A Summary Report; www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/.../Rice/sustintriceprod.pdf, (consulta: 10 de setiembre de 2012).
11. Asociación de Cultivadores de Arroz, Buenas Prácticas Agrícolas. http://www.aca.com.uy/index.php?option=com_content&view=section&layout=blog&id=2&Itemid=8, (consulta: 25 de setiembre de 2011).
12. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional de Corrientes, Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para el Cultivo de Arroz en Corrientes; <http://inta.gob.ar/documentos/guia-de-buenas-practicas-agricolas-para-el-cultivo-de-arroz-en-corrientes/>, (consulta: 11 de setiembre de 2012).
13. Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas, Ministerio de Agricultura, Especificaciones Técnicas de Buenas Prácticas Agrícolas para el Cultivo de Arroz; Chile, **2008**; pp. 1-56.
14. Tommasino, H. EL Cultivo de Arroz en Uruguay Contribución a su Conocimiento; Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca: Montevideo, Uruguay, **2003**.
15. Asociación de Cultivadores de Arroz, El cultivo en Uruguay. http://www.aca.com.uy/oldsite/el_cultivo.html, (consulta: 25 de setiembre de 2011).
16. Rojas K. Uruguay, Grain and Feed, Reporte UY4004, Rice Production 2004; USDA Foreign Agricultural Service, **2004**, pp. 1-7, www.fas.usda.gov/gainfiles/200412/146118297.pdf, (consulta: 11 de setiembre de 2012).
17. Fillâtre, Y.; Rondeau, D.; Bonnet, B.; Daguin, A.; Jadas-Hécart, A.; Communal, P.Y. Multiresidue Analysis of Multiclass Pesticides in Lavandin Essential Oil by LC/MS/MS. Using the Scheduled Selected Reaction Monitoring Mode. Analytical Chemistry **2011**, 83, 109-117.
18. Méndez, J.A. Recopilación de las estadísticas básicas del sector arrocero; Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca: Montevideo, **2009**; pp. 22.
19. Kuster, M.; López de Alda, M.J.; Barata, C.; Raldúa, D.; Barceló, D. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta **2008**, 75, 390-401.
20. Esty, C.D.; Srebotnjak, M.L., de Sherbinin, A. 2005 Environmental Sustainability Index: Benchmarking National Environmental Stewardship. <http://sedac.ciesin.columbia.edu/data/collection/es/> (consulta: 7 noviembre de 2011).

21. Phong, T.K.; Yoshino, K.; Hiramatsu, K.; Harada, M.; Inoue, T. Pesticide discharge and water management in a paddy catchment in Japan. *Paddy and Water Environment* **2010**, *8*, 361-369.
22. Struik, P.C.; Kropff, M.J.K. An Agricultural Vision. In *Pesticides: Problems, Improvements, Alternatives*, F. den Hond, P. G., N. M. van Straalen, Eds. Blackwell Science Ltd.: Oxford, Reino Unido, **2003**; pp. 15-25.
23. Charudattan, R.; Wyss, G.S.; Chandramohan, S. Biological Control. In *Pesticides in Agriculture and the Environment*, Wheeler, W.B., Ed. Gainesville, Florida, **2002**; pp. 34.
24. Guest, R.T.; Shwartz, P.H. Pest Management Issues on Minor Crops. In *Pesticides in Agriculture and the Environment*, Wheeler, W.B., Ed. Gainesville, Florida, **2002**; pp. 32.
25. Codex Alimentarius, Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento. In *Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias*, FAO, Roma: Roma, **1997**.
26. European Commission, Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, *Official Journal of the European Communities*: **1991**, pp. 290.
27. Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur, <http://www.cosave.org/acerca-de-cosave.php> (consulta: 27 de setiembre),
28. Tomlin, C., *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council Farnham, Reino Unido, **1996**, pp. 32-57.
29. Alder, L.; Greulich, K.; Kempe, G.; Vieth, B. Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25*, 838-865.
30. Cremllyn, R.J. *Agrochemicals, Preparation and Mode of Action*. 2nd ed.; John Wiley & sons, **1991**, pp. 406.
31. Unsworth, J. History of Pesticide Use. http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31 (consulta: 10 de junio de 2012).
32. MGK, About Pyrethrum. http://www.pyrethrum.com/About_Pyrethrum/History.aspx (consulta: 11 de setiembre de 2012)
33. Ware, G.W.; Whitcare, D.M. An Introduction to Insecticides <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm> (consulta: 15 de junio de 2012).
34. Ramírez, J.A.; Lacasaña, M. Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología y Medición de la Exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor.* **2001**, *4*, pp. 67-75.
35. Agropages.com The Story of Sulfonylurea Herbicides. <http://news.agropages.com/Wiki/Detail---2777.htm> (consulta: 11 de junio de 2012),
36. EU Reference Laboratories (EURLs) for Residues of Pesticides, <http://www.eurl-pesticides-datapool.eu/default.aspx?ziel=asp/en/stoff.aspx>, (consulta: 25 de julio de 2012)
37. World Health Organization, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. In WHO: Geneva, **2009**; pp. 54.
38. Boreen, A.L.; Arnold, W.A.; McNeill, K. Triplet-Sensitized Photodegradation of Sulfa Drugs Containing Six-Membered Heterocyclic Groups: Identification of an SO₂ Extrusion Photoproduct. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 3630-3638.
39. Decreto 294/2004, Disposiciones reglamentarias en materia de etiquetado de productos fitosanitarios, En *Diario oficial*: **2004**; Vol. 26.570, pp. 5.
40. Arias-Estévez, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.C.; Mejuto, L.; García-Río, L. The Mobility and Degradation of Pesticides in Soils and the Pollution of Groundwater Resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2008**, *123*, 247-260.
41. Gavrilescu, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering in Life Sciences* **2005**, *5*, 497-526.
42. Zacharia, J.T. Ecological Effects of Pesticides. En *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*, Stoytcheva, M., Eds. In Tech: Nueva York, Estados Unidos, **2011**, pp. 129-142.
43. Cortinas de Nava, C. Comunicación de Riesgos para el Manejo de Sustancias Peligrosas con Énfasis en Residuos Peligrosos. En *Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, Méjico, **2000**; pp. 60.
44. European Commission, The FOOTPRINT Pesticide Properties Database. www.eu-footprint.org (consulta: 8 de noviembre de 2012).
45. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A.H. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America. <http://www.pesticideinfo.org/>, (consulta: 8 de noviembre de 2011).

46. Cantou, G.; Roel, A.; Carlomagno, M.; González-Sapienza, G. Agregado de Valor a Través de la Gestión Ambiental. Revista Arroz, Asociación de Cultivadores de Arroz: Montevideo, **2009**, 59, pp 34-36.
47. Franquet Bernis, J.M.; Borrás Pámies, C. Variedades y Mejora del Arroz (*Oryza sativa*, L.). Universidad Internacional de Cataluña y la Asociación de Ingenieros Agrónomos de Cataluña. España, **2004**.
48. European Commission, Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions, Thematic Strategy for Soil Protection, Bruselas, **2006**; pp. 12.
49. Müller, K.; Magesan, G.N.; Bolan, N.S. A critical Review of the Influence of Effluent Irrigation on the Fate of Pesticides in Soil. Agriculture, Ecosystems and Environment **2007**, 120, 93-116.
50. Instituto Nacional de Ecología, Los plaguicidas y su transporte en el ambiente; <http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/>, (consulta: 11 de setiembre de 2012).
51. Rice, P.J.; Arthur, E.L.; Barefoot, A.C. Advances in Pesticide Environmental Fate and Exposure Assessments. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2007**, 55, 5367-5376.
52. Ministerio de Agricultura, Environmental Fate of Pesticides. http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/c_2.htm, (consulta: 4 de noviembre de 2011).
53. Rucks, L.; García, F.; Kaplan, A.; Ponce De León, J.; Hill, M. Propiedades Físicas del Suelo. Departamento de Suelos y Agua, Facultad de Agronomía, Montevideo, <http://www.fagro.edu.uy/~edafologia/curso/Material%20de%20lectura/FISICAS/fisicas.pdf>, (consulta: 11 de setiembre de 2012).
54. Universidad de Granada, Departamento de Edafología y Química Agrícola, Propiedades Físicas, <http://edafologia.ugr.es/introeda/tema04/text.htm#anchor618597>, (consulta: 11 de setiembre de 2012).
55. Alletto, L.; Coquet, Y.; Benoit, P.; Heddadj, D.; Barriuso, E. Tillage Management Effects on Pesticide Fate in Soils. A review. Agronomy for Sustainable Development **2010**, 30, 367-400.
56. European Commission, Decision No 1600/2002/EC of the European Parliament and of the Council of 22 July 2002 laying down the Sixth Community Environment Action Programme, L 242, Official Journal of the European Communities: **2002**; pp. 15.
57. Presidencia de la República, Ley 15.239, Uso y Conservación de los Suelos y de las Aguas, Diario Oficial: Montevideo, **1982**.
58. Presidencia de la República, Decreto 405/08, Uso Responsable y Sostenible de los Suelos, Diario Oficial: Montevideo, **2008**; pp. 4.
59. Thompson, T.; Fawell, J.; Kunikane, S.; Jackson, D.; Appleyard, S.; Callan, P.; Bartram, J.; Kingston, P. Chemical Safety of Drinking-Water: Assessing Priorities for Risk Management; World Health Organization: Génova, **2007**; pp. 160.
60. Papadopoulou-Mourkidou, E.; Karpouzas, D.G.; Patsias, J.; Kotopoulou, A.; Milothridou, A.; Kintzikoglou, K.; Vlachou, P. The Potential of Pesticides to Contaminate the Groundwater Resources of the Axios River Basin. Part II. Monitoring Study in the South Part of the Basin. Science of the Total Environment **2004**, 321, 147-164.
61. Abdullah, A.R.; Bajet, C.M.; Matin, M.A.; Nhan, D.D.; Sulaiman, A.H. Ecotoxicology of Pesticides in the Tropical Paddy Field Ecosystem. Environmental Toxicology and Chemistry **1997**, 16, 59-70.
62. Halwart, M. Biodiversity, Nutrition and Livelihoods in Aquatic Rice-Based Ecosystems. Biodiversity **2008**, 9, 36-40.
63. Stoate, C.; Báldi, A.; Beja, P.; Boatman, N.D.; Herzon, I.; van Doorn, A.; de Snoo, G.R.; Rakosy, L.; Ramwell, C. Ecological Impacts of Early 21st Century Agricultural Change in Europe – A review. Journal of Environmental Management **2009**, 91, 22-46.
64. European Commission, Council Directive 76/464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community, L 64, Official Journal of the European Union: **1976**; pp. 17.
65. European Commission, Council Directive No 80/778/EEC of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption. L 229, Official Journal of the European Union: **1980**; pp. 19.
66. European Commission, Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. L 330, Official Journal of the European Communities: **1998**; pp. 19.
67. European Commission, Council Directive No 91/271/EEC of 21 May, concerning urban waste water treatment, L135, Official journal of the European Communities: **1991**; pp. 52.

68. European Commission, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, L 327, Official Journal of the European Communities: **2000**, pp. 72.
69. European Commission, Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Union: **2008**; L 348, pp. 97.
70. European Commission, Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, L 331, Official Journal of the European Communities: **2001**, pp. 1-5.
71. European Commission, Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of ground water against pollution and deterioration. Official Journal of the European Union: **2006**; L 372, pp. 19-31.
72. Agencia de Protección Ambiental, Drinking Water Contaminants. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm> (consulta: 10 de noviembre de 2012).
73. Gallagher, J. Environmental Protection Agency, Citizen's Guide To Ground-Water Protection, **1990**; pp 34, <http://water.epa.gov/type/groundwater/>, (consulta: 10 de octubre de 2011).
74. Agencia de Protección Ambiental, National Recommended Water Quality Criteria. National Recommended Water Quality Criteria, <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/index.cfm>, (consulta: 10 de junio de 2012).
75. Presidencia de la República, República Oriental del Uruguay., Decreto 253/79, Diario Oficial: Montevideo, **1979**; pp. 14.
76. Presidencia de la República, Ministerio de Salud Pública, Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto N° 315/994, Diario Oficial: Montevideo, **1994**; pp. 454.
77. Presidencia de la República, Ministerio de Salud Pública, Decreto 110/011, Diario Oficial: Montevideo, 2011.
78. Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, Agua Potable, Requisitos. Norma Unit 833: **2008**, pp 19.
79. El arroz. www.botanical-online.com/arroz.htm (consulta 16 de agosto de 2011).
80. Matz, S.A. The Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed. In The Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed, 2nd ed.; Van Nostrand Resnhold Ed: New York, **1991**; pp 230-232.
81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, El Arroz es Vida. <http://www.fao.org/rice2004/es/rice1.htm> (consulta: 25 de setiembre de 2012).
82. The rice association, Production, <http://www.riceassociation.org.uk/content/1/2/production.html> (consulta: 28 de setiembre de 2011).
83. Champagne, E.T.; Wood, D.F.; Juliano, B.O.; Bechtel, D.B. The Rice Grain and its Gross Composition. In Rice, Chemistry and Technology, 3era ed.; Champagne, E.T., Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc.: St. Paul. Minnesota, **2004**; pp 77-100.
84. Arregocés, O.; Rosero, M.; González, J. Morfología de la Planta de Arroz. <http://webapp.ciat.cgiar.org/riceweb/morphology.htm> (consulta: 28 de setiembre de 2011).
85. Pareja, L.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Fernández-Alba, A.R. Analytical Methods for Pesticide Residues in Rice. TrAC - Trends in Analytical Chemistry **2011**, 30, 270-291.
86. Bond, N. Rice Milling. In Rice: Chemistry and Technology, 3era ed.; Champagne, E.T., Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc.: St. Paul. Minnesota, **2004**; pp 283-328.
87. Rainbolt, C. Weed Management in Rice In Florida, **2006**.
88. S.K. de Datta, Principles and Practices of Rice Production. 1 ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, **1981**; pp 10.
89. Hollier, C.A. Louisiana Rice Production Handbook. **1987**; pp. 116.
90. Plant Production and Protection Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Global workshop on red rice control; Varadero, **1999**, pp. 156.
91. Eleftherohorinos, I.G.; Dhima, K.V. Red Rice (*Oryza sativa*) Control in Rice (*O. sativa*) with Preemergence and Postemergence Herbicides. Weed Technology 2002. **2002**, 16, 4.

92. Mew, T.W.; Gonzales, P. Identification of Fungi Detected on Rice Seed. In A handbook of rice seedborne fungi, International rice research institute, Ed. Enfield, NH Science Publishers: Makati City, Philippines, **2002**; pp 31-35.
93. Deambrosi, E. La Sustentabilidad de Nuestro Sistema de Producción de Arroz en Relación al Uso de Agroquímicos. Revista Arroz, Asociación de Cultivadores de Arroz: Montevideo, **2007**, 49, pp 15-23.
94. Bentancourt, C.M.; Scatoni, I.B. Lepidópteros de Importancia Económica en Uruguay. 2da ed.; Facultad de Agronomía: Montevideo, pp. 234-245, 335, 349-352, 353-359, 388.
95. Bentancourt, C.M.; Scatoni, I.B. Guía de Insectos y Acaros de Importancia Agrícola y Forestal. 3era ed.; Editorial Hemisferio Sur, Facultad de Agronomía: Montevideo, 2010; pp. 582.
96. Hill, M.; Clérici, C. Residualidad de Agroquímicos en Arroz. Revista Arroz, Asociación de Cultivadores de Arroz, Montevideo: **2008**, 35, pp. 37-48.
97. Naylor, R. Herbicide Use in Asian Rice Production: Perspectives from Economics, Ecology and the Agricultural Sciences. In Herbicides in Asian Rice: Transitions in Weed Management, Naylor, R., Ed. International Rice Research Institute: Manila, Filipinas, **1996**; pp. 2-35.
98. Shibayama, H. Weeds and Weed Management in Rice Production in Japan. Weed Biology and Management **2001**, 1, 53-60.
99. Rice Crop Protection Guide 2012.
<http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/broadacre/summer-crops/rice/rice-crop-protection-guide>, (consulta: 12 de setiembre de 2012).
100. Modernel, P., Guía para la Protección y Fertilización Vegetal. 10 ed.; Oleaurre, M. Ed, Canelones, **2007**; pp. 479.
101. Shah, A.M.; Ali, M.A.; Chaudhary, S.; Iqbal, S.; Population Trends and Chemical Control of Rice Leaf Folder Cnaphalocrocis medinalis on Rice Crop, International Journal of Agriculture & Biology, **2003**, 5, 615-617.
102. Holland, P.T.; Hamilton, D.; Ohlin, B.; Skidmore, M.W. Effects of Storage and Processing on Pesticide Residues in Plant Products. Pure and Applied Chemistry **1994**, 66, 335-356.
103. Chen, C.; Li, Y.; Chen, M.; Chen, Z.; Qian, Y.; Organophosphorus Pesticide Residues in Milled Rice (*Oryza sativa*) on the Chinese Market and Dietary Risk Assessment. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment **2009**, 26, 340-347.
104. Kaushik, G.; Satya, S.; Naik, S.N. Food Processing a Tool to Pesticide Residue Dissipation - A review. Food Research International **2009**, 42, 26-40.
105. Report o f the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues; FAO/OMS: Rome.
106. BfR compilation on processing factors for pesticide residues
<http://www.bfr.bund.de/en/pesticides-579.html>, (consulta: 28 de setiembre de 2011).
107. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations Pesticide Residues in Food- **2004**, Roma: 2004; pp. 383.
108. Codex alimentarius. <http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do> (consulta: 2 de octubre de 2012).
109. Wessel, J.R. Codex Committee on Pesticide Residues-A Plan for Improved Participation by Governments. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 1992, 116, 126- 149.
110. FAO/WHO Food Standards Programme Joint, Codex Alimentarius Commission, Committee of the Codex Executive, Alimentarius Commission, Determination, Interpretation and Application of Residue Limits. Food Control **1997**, 8, 55-62.
111. Presidencia de la República, Ministerio de Salud Pública, Decreto 285/009, Modificaciones al Reglamento Bromatológico Nacional. Diario Oficial: Montevideo, **2009**.
112. International Maximum Residue Level Database, <http://www.mrl-database.com/results.cfm>, (consulta: 3 de enero de 2012).
113. Pesticides-online. <http://www.pesticides-online.com/> (consulta: 27 de setiembre de 2011).
114. Nguyen, T.D.; Han, E.M.; Seo, M.S.; Kim, S.R.; Yun, M.Y.; Lee, D.M.; Lee, G.H. A Multi-Residue Method for the Determination of 203 Pesticides in Rice Paddies Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Analytica Chimica Acta **2008**, 619, 67-74.
115. Cho, S.K.; El-Aty, A.M.A.; Park, Y.S.; Choi, J.H.; Khay, S.; Kang, C.A.; Park, B.J.; Kim, S.J.; Shim, J.H. A Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Polished Rice

- (*Oryza sativa* L.) Using Accelerated Solvent Extraction and Gas Chromatography and Confirmation by Mass Spectrometry. *Biomedical Chromatography* **2007**, 21, 602-609.
116. Nguyen, T.D.; Byung, S.L.; Bo, R.L.; Dae, M.L.; Lee, G.H. A Multiresidue Method for the Determination of 109 Pesticides in Rice Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Sample Preparation Method and Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Temperature Control and Vacuum Concentration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, 3115-3122.
117. Takatori, S.; Okihashi, M.; Okamoto, Y.; Kitagawa, Y.; Kakimoto, S.; Murata, H.; Sumimoto, T.; Tanaka, Y. A rapid and easy multiresidue method for the determination of pesticide residues in vegetables, fruits, and cereals using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **2008**, 91, 871-883.
118. Lee, S.J.; Park, H.J.; Kim, W.; Jin, J.S.; El-Aty, A.M.A.; Shim, J.H.; Shin, S.C. Multiresidue Analysis of 47 Pesticides in Cooked Wheat Flour and Polished Rice by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Biomedical Chromatography* **2009**, 23, 434-442.
119. European Commission, Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009, concerning the placing of plant protection products on the market, L 309, Official Journal of the European Communities: **2009**.
120. Mattice, J.D.; Skulman, B.W.; Norman, R.J.; Gbur E.E. Analysis of river water for rice pesticides in eastern Arkansas from 2002 to 2008. *Journal of Soil and Water Conservation* **2010**, 65, 130-140.
121. Sánchez-Brunete, C.; Albero, B.; Tadeo, J.L. Determination of Pesticides in Soil. In *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, Tadeo, J.L., Ed. CRC Press: Boca Ratón, **2008**; pp. 207-231.
122. Santos, T.C.R.; Rocha, J.C.; Barceló, D. Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibric acid using on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **2000**, 879, 3-12.
123. Baugros, J.B.; Cren-Olivé, C.; Giroud, B.; Gauvrit, J.Y.; Lantéri, P.; Grenier-Loustalot, M.F. Optimisation of Pressurised Liquid Extraction by Experimental Design for Quantification of Pesticides and Alkyl Phenols in Sludge, Suspended Materials and Atmospheric Fallout by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 4941-4949.
124. García-Valcárcel, A.I.; Tadeo, J.L. A Combination of Ultrasonic Assisted Extraction with LC-MS/MS for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Sludge. *Analytica Chimica Acta* **2009**, 641, 117-123.
125. Niell, S.; Pareja, L.; Geis Asteggiante, L.; Roehrs, R.; Pizzutti, I.R.; García, C.; Heinzen, H.; Cesio, M.V. Development of Methods for Multiresidue Analysis of Rice Post-Emergence Herbicides in Loam Soil and Their Possible Applications to Soils of Different Composition. *Journal of AOAC International* **2010**, 93, 425-431.
126. Fernández-Alba, A.R.; García-Reyes, J.F. Large-Scale Multi-Residue Methods for Pesticides and Their Degradation Products in Food by Advanced LC-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2008**, 27, 973-990.
127. Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. Methods of Sample Preparation for Determination of Pesticide Residues in Food Matrices by Chromatography-Mass Spectrometry-Based Techniques: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 1663-1683.
128. Turiel, E.; Martín-Esteban, A. Sample Handling of Pesticides in Food and Environmental Samples. In *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, Tadeo, J. L., Ed. CRC Press: Boca Ratón, **2008**; pp 36-56.
129. Mol, H.G.J.; Rooseboom, A.; Van Dam, R.; Roding, M.; Arondeus, K.; Sunarto, S. Modification and re-Validation of the Ethyl Acetate-Based Multi-Residue Method for Pesticides in Produce. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 1715-1754.
130. Barceló, D. *Comprehensive Analytical Chemistry Elsevier*: **2005**; 43, pp. 269-401.
131. Gan, J.; Bondarenko, S. Determination of Pesticides in Water. In *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, Tadeo, J.L., Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, **2008**.
132. Mills, P.A.; Onley, J.H.; Gaither, R.A. Rapid Method for Chlorinated Pesticide Residues in Non Fatty Foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1963**, 46, 6-10.
133. Mattice, J. Does pesticide use in rice production in arkansas lead to environmental problems? *Journal of Soil and Water Conservation* **2010**, 65-69.

134. Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International* **2003**, 86, 412-431.
135. Luke, M.A.; Froberg, J.E.; Masumoto, H.T. Extraction and Cleanup of Organochlorine, Organophosphate, Organonitrogen, and Hydrocarbon Pesticides in Produce for Determination by Gas-Liquid Chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1975**, 58, 1020-1026.
136. Luke, M.A.; Froberg, J.E.; Doose, G.M.; Masumoto, H.T. Improved Multiresidue Gas Chromatographic Determination of Organophosphorus, Organonitrogen, and Organohalogen Pesticides in Produce, Using Flame Photometric and Electrolytic Conductivity Detectors. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1981**, 64, 1187-1195.
137. European Reference Laboratory for Pesticide Residues, Multiresidue Method using Mini-Luke followed by GC-QqQ-MS/MS for Fruits and Vegetables European Reference Laboratory: Almería, **2011**; p 11.
138. Specht, W.; Pelz, S.; Gilsbach, W. Gas-chromatographic Determination of Pesticide Residues After Clean-up by Gel-Permeation Chromatography and Mini-Silica Gel-Column chromatography - 6. Communication: Replacement of dichloromethane by ethyl acetate/cyclohexane in liquid-liquid partition and simplified conditions for extraction and liquid-liquid partition. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1995**, 353, 183-190.
139. Ochsenbein, U.; Zeh, M.; Berset, J.D. Comparing solid phase extraction and direct injection for the analysis of ultra-trace levels of relevant explosives in lake water and tributaries using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **2008**, 72, 974-980.
140. Huang, S.B.; Mayer, T.J.; Yokley, R.A. Direct aqueous injection LC-ESI/MS/MS analysis of water for 11 chloro- and thiomethyltriazines and metolachlor and its ethanesulfonic and oxanilic acid degradates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 2595-2602.
141. Agüera, A.; Piedra, L.; Hernando, M.D.; Fernández-Alba, A.R.; Contreras, M. Splitless Large-Volume GC-MS Injection for the Analysis of Organophosphorus and Organochlorine Pesticides in Vegetables Using a Miniaturised Ethyl Acetate Extraction. *Analyst* **2000**, 125, 1397-1402.
142. Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B.G. Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables with Ethyl Acetate Extraction Using Gas and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 1773-1789.
143. Rial-Otero, R.; Gaspar, E.M.; Moura, I.; Capelo, J.L. Chromatographic-Based Methods for Pesticide Determination in Honey: An overview. *Talanta* **2007**, 71, 503-514.
144. Anastassiades, M.; Scherbaum, E. Sample handling and clean-up procedures II-new developments. In *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, Barceló, D. Ed. Elsevier: Amsterdam, Países Bajos, **2005**; 43, pp. 113-233.
145. Đurović, R.; Đorđević, T. Modern Extraction Techniques for Pesticide Residue Determination in Plant and Soil Samples. In *Pesticides in the Modern World, Trends in Pesticide Analysis*, Stoytcheva, M., Ed. Intech open: Rijeka, **2011**; pp. 222-246.
146. Koesukwiwat, U.; Sanguankaew, K.; Leepipatpiboon, N. Rapid Determination of Phenoxy Acid Residues in Rice by Modified QuEChERS Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 626, 10-20.
147. Waters SPE Oasis. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209> (consulta: 15 de noviembre de 2012).
148. Niell, S.; Pareja, L.; Geis Asteggianti, L.; Cesio, M.V.; Heinzen, H. Comparison of Extraction Solvents and Conditions for Herbicide Residues in Milled Rice with Liquid Chromatography-Diode Array Detection Analysis (LC-DAD). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **2010**, 27, 206-211.
149. Anastassiades, M. QuEChERS, A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. CVUA: Stuttgart, pp. 12, <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>, (consulta 12 de setiembre de 2012).
150. Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. Analysis of Pesticide Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid

- Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 1697-1714.
151. Mol, H.G.J.; Plaza-Bolaños, P.; Zomer, P.; De Rijk, T.C.; Stolker, A.A.M.; Mulder, P.P.J. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 9450-9459.
152. Yang, X.B.; Ying, G.G.; Kookana, R.S. Rapid Multiresidue Determination for Currently Used Pesticides in Agricultural Drainage Waters and Soils Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **2010**, 45, 152-161.
153. Anastassiades, M.; Scherbaum, E.; Taúdelen, B.; Štajnbaher, D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. In *Pesticide Chemistry*, H. Ohkawa, H.M., P.W. Lee, Eds. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2007**; p 497.
154. Lehotay, S.J.; Maštovská, K.; Lightfield, A.R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *Journal of AOAC International* **2005**, 88, 615-629.
155. Lehotay, S.J. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues. In *Pesticide Protocols*, José L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich., Eds. Humana Press: Almeria, España, **2006**; pp 239-260.
156. Lehotay, S.J.; Tully, J.; García, A.V.; Contreras, M.; Mol, H.; Heinke, V.; Anspach, T.; Lach, G.; Fussell, R.; Mastovska, K.; Poulsen, M.E.; Brown, A.; Hammack, W.; Cook, J.M.; Alder, L.; Lindtner, K.; Vila, M.G.; Hopper, M.; De Kok, A.; Hiemstra, M.; Schenck, F.; Williams, A.; Parker, A. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* **2007**, 90, 485-520.
157. Mastovska, K.; Dorweiler, K.J.; Lehotay, S.J.; Wegscheid, J.S.; Szpylka, K.A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 5959-5972.
158. Walorczyk S. Development of a Multi-Residue Screening Method for the Determination of Pesticides in Cereals and Dry Animal Feed Using Gas Chromatography-Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry II. Improvement and Extension to New Analytes. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1208, 202-214.
159. Powley, C.R. Sulfonylurea Herbicides. In *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, Lee, P. W., Eds. John Wiley & Sons Ltd: Newark, 2003; Vol. 1&2, pp. 400-420.
160. Arora, S.; Mukherjee, I.; Trivedi, T.P. Determination of Pesticide Residue in Soil, Water and Grain from IPM and Non-IPM Field Trials of Rice. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2008**, 81, 373-376.
161. Andreu, V.; Picó, Y. Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Soil: Critical Review and Comparison of Methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23, 772-789.
162. Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. Determination of the Fungicides Vinclozolin and Dicloran in Soils Using Ultrasonic Extraction Coupled with Solid-Phase Microextraction. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 514, 125-130.
163. Tor, A.; Aydin, M.E.; Özcan, S. Ultrasonic Solvent Extraction of Organochlorine Pesticides from Soil. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 559, 173-180.
164. Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Tadeo, J.L. Multiresidue Analysis of Fungicides in Soil by Sonication-Assisted Extraction in Small Columns and Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, 976, 319-327.
165. Sánchez-Brunete, C.; Rodríguez, A.; Tadeo, J.L. Multiresidue Analysis of Carbamate Pesticides in Soil by Sonication-Assisted Extraction in Small Columns and Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1007, 85-91.
166. Fenoll, J.; Hellín, P.; Marín, C.; Martínez, C.M.; Flores, A.P. Multiresidue Analysis of Pesticides in Soil by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection and Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 7661-7666.
167. Ranz, A.; Maier, E.; Motter, H.; Lankmayr, E. Extraction and Derivatization of Polar Herbicides for GC-MS Analyses. *Journal of Separation Science* **2008**, 31, 3021-3029.
168. Ye, G.; Zhang, W.; Cui, X.; Pan, C.; Jiang, S. Determination and Quantitation of Ten Sulfonylurea Herbicides in Soil Samples Using Liquid Chromatography with Electrospray

- Ionization Mass Spectrometric Detection. Chinese Journal of Analytical Chemistry **2006**, 34, 1207-1212.
169. Shen, X.; Su, Q.; Zhu, X.; Gao, Y. Determination of Pesticide Residues in Soil by Modified Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography. *Annali di Chimica* **2007**, 97, 647-654.
170. Wu, Q.; Wang, C.; Liu, Z.; Wu, C.; Zeng, X.; Wen, J.; Wang, Z. Dispersive Solid-Phase Extraction Followed by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Some Sulfonylurea Herbicides in Soil by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 5504-5510.
171. Lesueur, C.; Gartner, M.; Mentler, A.; Fuerhacker, M. Comparison of Four Extraction Methods for the Analysis of 24 Pesticides in Soil samples with Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Ion Trap-Mass Spectrometry. *Talanta* **2008**, 75, 284-293.
172. Geiß, S.; Gebert, S. Extraction of Highly Polar Organophosphorus Pesticides from Water. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **2006**, 34, 464-473.
173. Jeannot, R.; Sabik, H.; Sauvard, E.; Genin, E. Application of Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Combined with Photodiode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry for Monitoring Pesticides in Surface Waters. *Journal of Chromatography A* **2000**, 879, 51-71.
174. Zanella, R.; Primel, E.G.; Gonçalves, F.F.; Kurz, M.H.S.; Mistura, C.M. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of Herbicide Residues in Surface and Agriculture Waters. *Journal of Separation Science* **2003**, 26, 935-938.
175. Ayano, E.; Kanazawa, H.; Ando, M.; Nishimura, T. Determination and Quantitation of Sulfonylurea and Urea Herbicides in Water Samples Using Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 507, 211-218.
176. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.R.; Herrero-Hernández, E.; Hernández-Méndez, J. Simultaneous Determination of Phenyl- and Sulfonylurea Herbicides in Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with UV Diode Array or Mass Spectrometric Detection. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 517, 71-79.
177. Polati, S.; Bottaro, M.; Frascarolo, P.; Gosetti, F.; Gianotti, V.; Gennaro, M.C. HPLC-UV and HPLC-MSⁿ Multiresidue Determination of Amidosulfuron, Azimsulfuron, Nicosulfuron, Rimsulfuron, Thifensulfuron Methyl, Tribenuron Methyl and Azoxystrobin in Surface Waters. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 579, 146-151.
178. Mazzella, N.; Delmas, F.; Delest, B.; Méchin, B.; Madigou, C.; Allenou, J.P.; Gabelle, R.; Caquet, T. Investigation of the Matrix Effects on a HPLC-ESI-MS/MS Method and Application for Monitoring Triazine, Phenylurea and Chloroacetanilide Concentrations in Fresh and Estuarine Waters. *Journal of Environmental Monitoring* **2009**, 11, 108-115.
179. Ouyang, X.; Zhang, W.; Xu, J.; Chang, N.; Pan, C.; Zhang, J.; Niu, W. Determination of Sulfonylurea Herbicides in Water Using Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography with Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* **2009**, 64, 935-940.
180. van Pinxteren, M.; Bauer, C.; Popp, P. High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of 10 Pesticides in Water: A comparison Between Membrane-Assisted Solvent Extraction and Solid Phase Extraction. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 5800-5806.
181. Santos, T.C.R.; Rocha J.C.; Barceló, D. Determination of Rice Herbicides, Their Transformation Products and Clofibric Acid Using On-Line Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography with Diode Array and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography A* **2000**, 879, 3-12.
182. Losito, I.; Amorisco, A.; Carbonara, T.; Lofiego, S.; Palmisano, F. Simultaneous Determination of Phenyl- and Sulfonyl-urea Herbicides in River Water at Sub-Parts-Per-Billion level by On-Line Preconcentration and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 575, 89-96.
183. Barrek, S.; Cren-Olivé, C.; Wiest, L.; Baudot, R.; Arnaudguilhem, C.; Grenier-Loustalot, M.F. Multi-Residue Analysis and Ultra-Trace Quantification of 36 priority Substances From the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in Surface Waters. *Talanta* **2009**, 79, 712-722.
184. Carabias-Martínez, R.; García Hermida, C.; Rodríguez-Gonzalo, H.E.; Soriano-Bravo, F.E.; Hernández-Méndez, J. Determination of Herbicides, Including Thermally Labile Phenylureas, by

- Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1002, 1-12.
185. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo E.; Fernández-Laesgada, M.E.; Calvo-Seronero, L.; Sánchez-San Román, F.J. Evolution Over Time of the Agricultural Pollution of Waters in an Area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Research* **2003**, 37, 928-938.
 186. Crespo-Corral, E.; Santos-Delgado, M.J. Polo-Díez, L.M; Soria, A.C. Determination of Carbamate, Phenylurea and Phenoxy Acid Herbicide Residues by Gas Chromatography After Potassium Tert-Butoxide/Dimethyl Sulphoxide/Ethyl Iodide Derivatization Reaction. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1209, 22-28.
 187. Zhang, W.G.; Chu, X.G.; Cai, H.X.; An, J.; Li, C.J. Simultaneous Determination of 109 Pesticides in Unpolished Rice by a Combination of Gel Permeation Chromatography and Florisil Column Purification, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, 20, 609-617.
 188. Aguilera, A.; Rodríguez, M.; Brotons, M.; Boulaid, M.; Valverde, A. Evaluation of Supercritical Fluid Extraction/Aminopropyl Solid-Phase "In-Line" Cleanup for Analysis of Pesticide Residues in Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 9374-9382.
 189. Liu, P.; Yuki, H.; Qin, Y.; Zhou, H.; Lin, J. Analysis of Pesticide Multiresidues in Rice by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Coupled with Solid Phase Extraction. *Chinese Journal of Chromatography* **2006**, 24, 228-234.
 190. Herrmann, S.S.; Poulsen, M.E. Determination of Pesticides in Cereals Using the QuEChERS Method and GC-ITD. In Copenhagen, 2008.
 191. Dórea, H.S.; Sobrinho, L.L. Analysis of Pesticide Residues in Rice Using Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2004**, 15, 690-694.
 192. Tsochatzis, E.D.; Menkissoglu-Spiroudi U.; Karpouzas, D.G.; Tzimou-Tsitouridou, R. A Multi-Residue Method for Pesticide Residue Analysis in Rice Grains Using Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 397, 2181-2190.
 193. Liu, S.; Zheng, Z.; Wei, F.; Ren, Y.; Gui, W.; Wu, H.; Zhu, G. Simultaneous Determination of Seven Neonicotinoid Pesticide Residues in Food by Ultraperformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 3271-3278.
 194. Pareja, L.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Fernández-Alba, A.R. Evaluation of Various QuEChERS Based Methods for the Analysis of Herbicides and Other Commonly Used Pesticides in Polished Rice by LC-MS/MS. *Talanta* **2011**, 83, 1613-1622.
 195. Thurman, E.M. Ferre, I.; Fernández-Alba, A.R. LC-MS. I: Basic Principles and Technical Aspects of LC-MS for Pesticide Analysis. In *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, Barceló, D., Ed. Wilson & Wilson's, Elsevier: Amsterdam, Países Bajos, **2005**; 43, pp. 368-400.
 196. Gross, J.H.; *Gas Phase Ion Chemistry*. In *Mass Spectrometry, A Text Book*, Springer, Ed. Heidelberg, Alemania, **2004**; pp. 15-16.
 197. Gross, J.H.; *Instrumentation*. In *Mass Spectrometry, A text Book*, Springer-Verlag: Heidelberg, Alemania, **2004**; pp. 113-119.
 198. Mc Lafferty, F.W.; Turecek, F. *Interpretation of Mass Spectra*. University Science Books: Sausalito, California, **1993**.
 199. Chromservis, Esquema del analizador de cuadrupolo, <http://chromservis.cz/?amount=0&blogid=18&lang=EN&x=0&y=0&allsections=1&query=quadrupole>, (consulta: 10 de agosto de 2012).
 200. Agilent Technologies, Inc., Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System, In *Concepts Guide*, Agilent Technologies, Inc: Santa Clara, USA, **2009**.
 201. Bruker Daltonics., esquire 6000, The High Performance ESI-Ion Trap MSⁿ System In Bruker Daltonics: 2012; <http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Esquire.html> (consulta: 5 de setiembre de 2012).
 202. Soler, C.; Picó, Y. Recent Trends in Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Determine Pesticides and Their Metabolites in Food. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2007**, 26, 103-115.
 203. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. Detection. In *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed.; Wiley & Sons: Nueva York, Estados Unidos, **2010**; pp 147-196.
 204. Patsias, J.; Papadakis E.N.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Herbicides and Their Phenolic Conversion Products in Soil by Microwave Assisted Solvent

- Extraction and Subsequent Analysis of Extracts by On-line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, 959, 153-161.
205. García-Reyes, J.F.; Hernando, M.D.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. Comprehensive Screening of Target, Non-Target and Unknown Pesticides in Food by LC-TOF-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2007**, 26, 828-841.
206. Picó, Y.; Font, G.; Moltó, J.C.; Mañes, J. Pesticide Residue Determination in Fruit and Vegetables by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2000**, 882, 153-173.
207. The University of Bristol, School of Chemistry, Mass Spectrometry Resource, 2004, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html> (consulta: 12 de julio de 2012).
208. Lacorte, S.; Fernández-Alba, A.R. Time of Flight Mass Spectrometry Applied to the Liquid Chromatographic Analysis of Pesticides in Water and Food. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, 25, 866-880.
209. Deterding, L.J.; Banks, G.C.; Tomer, K.B.; Archer, T.K. *Methods* **2004**, 33, 53-58.
210. Absciex Hardware Guide, 4000 QTRAP System, How the system works, <http://www.absciex.com/documents/downloads/literature/4000-Qtrap-hardware-guide.pdf>, (consulta: 3 de agosto de 2012).
211. Notijenck, Amplificando la certeza de la confirmación en monitoreo y cuantificación de pesticidas presentes en muestras de frutas y vegetales utilizando sistemas LC/MS-MS QTRAP, <http://notijenck.com.ar/?p=3038>, (consulta: 12 de julio de 2012).
212. Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Tschäppät, V.; Grivet, C.; Bourgonne, E.; Leuthold, L.A. Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer for the Analysis of Small Molecules and Macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39, 845-855.
213. Martínez Bueno, M.J.; Agüera, A.; Gómez, M.J.; Hernando, M.D.; García-Reyes, J.F.; Fernández-Alba, A.R. Application of Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 9372-9384.
214. Martínez Bueno, M.J.; Agüera, A.; Gómez, M.J.; Hernando, M.D.; Fernández-Alba, A.R. Evaluation of Various Liquid Chromatography-Quadrupole-Linear Ion Trap-Mass Spectrometry Operation Modes Applied to the Analysis of Organic Pollutants in Wastewaters. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 5995-6002.
215. Dabrowska, H.; Dabrowski, Ł.; Biziuk, M.; Gaca, J.; Namieśnik, J. Solid-Phase Extraction Clean-up of Soil and Sediment Extracts for the Determination of Various Types of Pollutants in a Single Run. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1003, 29-42.
216. Laganá, A.; Fago, G.; Marino, A.; Penazzi, V.M. Liquid Chromatography Mass Spectrometry Tandem for Multiresidue Determination of Selected Post-Emergence Herbicides After Soil Column Extraction. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 415, 41-56.
217. Gonçalves, C.; Alpendurada, M.F. Assessment of Pesticide Contamination in Soil Samples from an Intensive Horticulture Area, Using Ultrasonic Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Talanta* **2005**, 65, 1179-1189.
218. Fernández-Alvarez, M.; Llombart, M.; Lamas, J.P.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T. Simultaneous Determination of Traces of Pyrethroids, Organochlorines and Other Main Plant Protection Agents in Agricultural Soils by Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1188, 154-163.
219. Dagnac, T.; Bristeau, S.; Jeannot, R.; Mouvet, C.; Baran, N. Determination of Chloroacetanilides, Triazines and Phenylureas and Some of Their Metabolites in Soils by Pressurised Liquid Extraction, GC-MS/MS, LC-MS and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1067, 225-233.
220. Mamun, M.I.R.; Park, J.H.; Choi, J.H.; Kim, H.K.; Choi, W.J.; Han, S.S.; Hwang, K.; Jang, N.I.; Assayed, M.E.; El-Dib, M.A.; Shin, H.C.; El-Aty, A.M.A.; Shim, J.H. Development and Validation of a Multiresidue Method for Determination of 82 Pesticides in Water Using GC. *Journal of Separation Science* **2009**, 32, 559 - 574.
221. Tran, A.T.K.; Hyne, R.V.; Doble, P. Determination of Commonly Used Polar Herbicides in Agricultural Drainage Waters in Australia by HPLC. *Chemosphere* **2007**, 67, 944-953.
222. Bruzzoniti, M.C.; Sarzanini, C.; Costantino, G.; Fungi, M. Determination of Herbicides by Solid Phase Extraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Drinking Waters. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 578, 241-249.
223. Li, Y.; George, J.E.; McCarty, C.L.; Wendelken, S.C. Compliance Analysis of Phenylurea and Related Compounds in Drinking Water by Liquid Chromatography/Electrospray

- Ionization/Mass Spectrometry Coupled with Solid-Phase Extraction. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1134, 170-176.
224. Rodríguez, M.; Orescan, D.B. Confirmation and Quantitation of Selected Sulfonylurea, Imidazolinone, and Sulfonamide Herbicides in Surface Water Using Electrospray LC/MS. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 2710-2717.
225. Otake, T.; Aoyagi, Y.; Yaritha, T. Multiresidue Analysis and Monitoring of Pesticides in Rice by Pressurized Liquid Extraction. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **2009**, 44, 423-427.
226. Mou, R.X.; Chen, M.X.; Zhi, J.L. Simultaneous Determination of 15 Phenylurea Herbicides in Rice and Corn Using HPLC with Fluorescence Detection Combined with UV Decomposition and Post-Column Derivatization. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2008**, 875, 437-443.
227. Kaihara, A.; Yoshii, K.; Tsumura, Y.; Ishimitsu, S.; Tonogai, Y. Multi-residue Analysis of 18 Pesticides in Fresh Fruits, Vegetables and Rice by Supercritical Fluid Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Health Science* **2002**, 48, 173-178.
228. Valverde, A.; Aguilera, A.; Rodríguez, M.; Brotons, M. Evaluation of a Multiresidue Method for Pesticides in Cereals Using Supercritical Fluid Extraction and Gas Chromatographic Detection. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **2009**, 44, 204-213.
229. Liu, L.B.; Hashi, Y.; Qin, Y.P.; Zhou, H.X.; Lin, J.M. Development of Automated Online Gel Permeation Chromatography-Gas Chromatograph Mass Spectrometry for Measuring Multiresidual Pesticides in Agricultural Products. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, 845, 61-68.
230. Liu, L.; Yuki, H.; Qin, Y.; Zhou, H.; Lin, J. Rapid Analysis of Multiresidual Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography-mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2006**, 34, 783-786.
231. Pang, G.F.; Liu, Y.M.; Fan, C.L.; Zhang, J.J.; Cao, Y.Z.; Li, X.M.; Li, Z.Y.; Wu, Y.P.; Guo, T.T. Simultaneous Determination of 405 pesticide Residues in Grain by Accelerated Solvent Extraction Then Gas Chromatography-Mass Spectrometry or Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 384, 1366-1408.
232. Taverniers, I.; De Loose, M.; Van Bockstaele, E. Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23, 535-552.
233. European Commission, DG-SANCO, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. In Document No. SANCO/12495/2011, **2011**, pp. 1-40.
234. Vial, J.; Jardy, A. Experimental Comparison of the Different Approaches to Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. *Analytical Chemistry* **1999**, 71, 2672-2677.
235. Haslová, J.; Zrostliková J. Matrix Effects in (Ultra)Trace Analysis of Pesticide Residues in Food and Biotic Matrices. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1000, 181-197.
236. Krueve, A.; Künnapas A.; Herodes, K.; Leito, I. Matrix Effects in Pesticide Multi-residue Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1187, 58-66.
237. Niessen, W.M.A.; Manini, P.; Andreoli, R. Matrix Effects in Quantitative Pesticide Analysis Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, 25, 881-899.
238. Maštovská, K.; Lehotay, S.J.; Anastassiades, M. Combination of Analyte Protectants to Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 8129-8137.
239. Ferrer, C.; Lozano, A. Agüera, A.; Jiménez Girón, A.; Fernández-Alba, A.R. Overcoming Matrix Effects Using the Dilution Approach in Multiresidue Methods for Fruits and Vegetables. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 7634-7639.
240. Pareja, L.; Martínez Bueno, M.J.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Fernández-Alba, A.R. Trace Analysis of Pesticides in Paddy Field Water by Direct Injection Using Liquid Chromatography-Quadrupole-Linear Ion Trap-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 4790-4798.
241. European Commission, Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities*: **2002**; pp. 10-96.

242. Hincapié Pérez, M.; Peñuela, G. Maldonado, M.I.; Malato, O.; Fernández-Ibañez, P.; Oller, I.; Gernjak, W.; Malato, S. Degradation of Pesticides in Water Using Solar Advanced Oxidation Processes. *Applied Catalysis B: Environmental* **2006**, *64*, 272-281.
243. Comninellis, C.; Kapalka, A.; Malato, S.; Parsons, S.A.; Poullos, I.; Mantzavinos, D. Advanced Oxidation Processes for Water Treatment: Advances and Trends for R&D. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2008**, *83*, 769-776.
244. Malato, S.; Blanco J.; Vidal, A.; Richter, C. Photocatalysis With Solar Energy at a Pilot-Plant Scale: An Overview. *Applied Catalysis B: Environment*, **2002**, *37*, 1-15.
245. Malato, S.; Blanco, J.; Vidal, A.; Alarcón, D.; Maldonado, M.I.; Cáceres, J.; Gernjak, W. Applied Studies in Solar Photocatalytic Detoxification: An Overview. *Solar Energy* **2003**, *75*, 329-336.
246. Gogate, P.R.; Pandit, A.B. A Review of Comparative Technologies for Wastewater Treatment. I: Oxidation Technologies at Ambient Conditions. *Advances in Environmental Research* **2004**, *8*, 501-551.
247. Malato, S.; Fernández-Ibañez, P.; Maldonado, M.I.; Blanco, J.; Gernjak, W.; Decontamination and Disinfection of Water by Solar Photocatalysis: Recent Overview and Trends. *Catalysis Today* **2009**, *147*, 1-59.
248. Parmon, V.; Emeline, A.V.; Serpone, N. Glossary of Terms in Photocatalysis and Radiocatalysis- A Preliminary Version of IUPAC's Project 2001-036-1. *International Journal of Photoenergy* **2002**, *4*, 91-131.
249. Chatterjee, D.; Dasgupta, S. Visible Light Induced Photocatalytic Degradation of Organic Pollutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2005**, *6*, 186-205.
250. Chiron, S.; Fernández-Alba, A.R.; Rodríguez, A.; García-Calvo, E. Pesticide Chemical Oxidation: State-of-the-Art. *Water Research* **2000**, *34*, 366-377.
251. Malato, S.; Blanco, J.; Herrmann, J.M. Solar Catalysis for Water Decontamination. *Catalysis Today* **1999**, *54*, 191-377.
252. Herrmann, J.M. Heterogeneous Photocatalysis: Fundamentals and Applications to the Removal of Various Types of Aqueous Pollutants. *Catalysis Today* **1999**, *53*, 115-129.
253. Konstantinou, I.K.; Albanis, T.A. Photocatalytic Transformation of Pesticides in Aqueous Titanium Dioxide Suspensions Using Artificial and Solar Light: Intermediates and Degradation Pathways. *Applied Catalysis B: Environmental* **2003**, *42*, 319-335.
254. Chong, M.N.; Jin, B.; Chow, C.W.K.; Saintc, C. Recent Developments in Photocatalytic Water Treatment Technology: A review. *Water Research* **2010**, *44*, 2997-3027.
255. Pignatello, J.J. Dark and Photoassisted Iron (3+)-Catalyzed Degradation of Chlorophenoxy Herbicides by Hydrogen Peroxide. *Environmental Science & Technology*, **1992**, *26*, 944-951.
256. Ruppert, G.; Bauer, R.; Heisler, G. The photo-Fenton Reaction - an Effective Photochemical Wastewater Treatment Process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1993**, *73*, 75-78.
257. Legrini, O.; Oliveros, E.; Braun, A.M. Photochemical Processes for Water-Treatment. *Chemistry Review* **1993**, *93*, 671-698.
258. Carey, J.H.; Lawrence. J.; Tosine, H.M. Photodechlorination of PCB's in the Presence of Titanium Dioxide in Aqueous Suspensions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1976**, *16*, 697-701.
259. Roehrs, R.; Zanella, R.; Pizzutti, I.R.; Adaime, M.B.; Pareja, L.; Niell, S.; Cesio, M.V.; Heinzen, H. Liquid Chromatographic-Diode-Array Detection Multiresidue Determination of Rice Herbicides in Drinking and Paddy-Field Water. *Journal of AOAC International* **2009**, *92*, 1190-1195.
260. Díez, C.; Traag, W.A.T.; Zommer, P.; Marinero, P.; Atienza, J. Comparison of an Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" Method with Classical Multi-Residue Methods for the Extraction of Herbicide Residues in Barley Samples. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1131*, 11-23.
261. Food and Drug Administration, Pesticide Analytical Manual Volume I (PAM). <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/PesticideAnalysisManualPAM/cm111455.htm> (consulta: 5 de julio de 2011),
262. Brutti, M.; Blasco, C.; Picó, Y. Determination of Benzoylurea Insecticides in Food by Pressurized Liquid Extraction and LC-MS. *Journal of Separation Science* **2010**, *33*, 1-10.
263. Otake, T.; Aoyagi, Y.; Matsuo, M.; Itoh, N.; Yarita, T. Evaluation of Pressurized Liquid Extraction for the Analysis of Four Pesticides in Unpolished Rice. *Journal of Environmental*

- Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes **2008**, 43, 390-394.
264. Lehotay, S.J.; De Kok, A.; Hiemstra, M.; Van Bodegraven, P. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. *Journal of AOAC International* **2005**, 88, 595-614.
265. Lozano, A.; Martínez-Uroz, M.A.; Gómez-Ramos, M.J.; Gómez-Ramos, M.M.; Mezcua, M.; Fernández-Alba, A.R. Determination of Nicotine in Mushrooms by Various GC/MS- and LC/MS-Based Methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 402, 935-943.
266. Cabrera Reina, A.; Santos-Juanes Jordá L.; García Sánchez, J.L.; Casas López, J.L.; Sánchez Pérez, J.A. Modelling photo-Fenton process for organic matter mineralization, hydrogen peroxide consumption and dissolved oxygen evolution. *Applied Catalysis B: Environmental* **2012**, 119-120, 132-138.
267. Martínez Bueno, M.J.; Uclés, S. Hernando, M.D.; Fernández-Alba, A.R. Development of a Solvent Free Method for the Simultaneous Identification and Quantification of Drugs of Abuse and Their Metabolites in Environmental Water by LC-MS/MS. *Talanta* **2011**, 85, 157-166.
268. Navarro, S.; Vela, N.; Navarro, G. An Overview on the Environmental Behaviour of Pesticide Residues in Soil. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2007**, 5, 357-375.
269. Flury, M. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils-A review. *Journal of Environmental Quality* **1996**, 25, 25-45.
270. Pateiro-Moure, M.; Pérez-Novo, C.; Arias-Estévez, M.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. Effect of Organic Matter and Iron Oxides on Quaternary Herbicide Sorption-Desorption in Vineyard-Devoted Soils. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 333, 431-438.
271. Wulf, A.; Alexander, N.; Volker, L. Multiresidue Determination of Pesticides in Acid-Clay Soils from Thailand. *Journal of AOAC International* **2007**, 90, 1659-1669.
272. European Commission, Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. L 125, Official Journal of the European Communities: **2002**; pp. 10-96.
273. Ferrer, C.; Mezcua, M.; Martínez-Uroz, M.A.; Pareja, L.; Lozano, A.; Fernández-Alba, A.R. Method Development and Validation for Determination of Thiosultap Sodium, Thiocyclam, and Nereistoxin in Pepper Matrix. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 398, 2299-2306.
274. Kmeilár, B.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Fodor, P.; Fernández-Alba, A.R. Study of the Effects of Operational Parameters on Multiresidue Pesticide Analysis by LC-MS/MS. *Talanta* **2011**, 84, 262-273.
275. Kmeilár, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martínez-Uroz, M.A.; Valverde, A.; Fernández-Alba, A.R. Validation and Uncertainty Study of a Comprehensive List of 160 Pesticide Residues in Multi-Class Vegetables by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1215, 37-50.
276. Ferrer, C.; Martínez Bueno, M.J.; Lozano, A.; Fernández-Alba, A.R. Pesticide Residue Analysis of Fruit Juices by LC-MS/MS Direct injection. One Year Pilot Survey. *Talanta* **2011**, 83, 1552-1561.
277. Hunter, C.; Simons, B. The Scheduled MRM™ Algorithm Enables Intelligent Use of Retention Time During Multiple Reaction Monitoring. Application note, Applied Biosystems: Foster City, CA, **2008**.
278. Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. Comprehensive Comparison of Liquid Chromatography Selectivity as Provided by Two Types of Liquid Chromatography Detectors (High Resolution Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry): "Where is the Crossover Point?". *Analytica Chimica Acta* **2010**, 673, 60-72.
279. European Commission, Regulation (EC) No. 299/2008 of the European Parliament and of the Council of 11 March 2008 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. L 9, Official Journal of the European Communities: **2008**, pp. 68-71.
280. European Commission, Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels (MRLs) of pesticides in products of plant and animal origin defines a new fully harmonised set of rules for pesticide residues, L 70, Official Journal of the European Union: **2005**; pp. 1-47.
281. Chiron, S.; Minero, C.; Vione, D. Photodegradation Processes of the Antiepileptic Drug Carbamazepine, Relevant To Estuarine Waters. *Environmental Science & Technology* **2006**, 40, 5977 -5983.
282. Zanella, R.; Primel, E.G.; Gonçalves, F.F.; Martins, M.L.; Adaime, M.B.; Marchesan, E.; Machado, S.L.O. Study of the Degradation of the Herbicide Clomazone in Distilled and in

Irrigated Rice Field Waters Using HPLC-DAD and GC-MS. Journal of the Brazilian Chemical Society **2008**, 19, 987-995.