



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS

Grao en Química

Memoria Trabajo Fin de Grao

***Validación dun método analítico para a determinación
de triazinas en troita de acuicultura***

***Validación de un método analítico para la determinación
de triazinas en trucha de acuicultura***

***Validation of analytical method for determination of
triazines in aquaculture trout***

**Director(es):
María Elisa Beceiro González.
María José González Castro.**

**VERÓNICA CASTRO BUSTELO
Curso: 2014/2015 – Convocatoria: Xuño**

Agradecementos

Porque sacar adiante unha carreira sen o apoio de ninguén sería imposible, neste pequeno apartado gustaríame agradecer a todas aquelas persoas que me apoiaron e axudaron nesta etapa da miña vida.

En primeiro lugar, quero agradecer as miñas titoras de TFG Elisa e María José pola súa continua axuda e dedicación, así como ao Departamento de Química Analítica da Universidade da Coruña por permitirme levar a cabo este proxecto.

A Noelia, por todas as ensinanzas e coñecementos que me aportou durante a realización deste traballo, así como o seu apoio incondicional nos momentos máis frustrantes.

Mención especial a miña familia, sobre todo a miña nai e a meu pai polo apoio económico proporcionado durante todos estes anos. Tamén ao meu mozo por darme todo o cariño e apoio que me fai seguir adiante nos momentos máis difíciles.

Por último, a miña irmá Belinda, grazas por todos os consellos, axuda e cariño que me das, pois sen todo iso non podería chegar ata onde estou hoxe. Sei que sexa cal sexa o camiño que tome na vida sempre estarás aí para apoiarme. Moitas grazas por todo o que me ensinaches.

MOITAS GRAZAS A TODOS POR ESTAR AÍ



Neste traballo, validouse un método baseado na dispersión da matriz en fase sólida (MSPD) para a extracción de nove triazinas en mostras de troita. Nas condicións optimizadas, 0.2 g de mostra dispersáronse sobre 2 g de C18 e transferíronse a un cartucho con ENVI-Carb-II/SAX/PSA (500/500/500 mg). A mostra dispersada lavouse con 10 mL de n-hexano e os analitos eluíronse con 20 mL de acetato de etilo e 5 mL de acetonitrilo. O extracto concentrouse ata sequedade, redisolveuse en 1 mL de metanol e inxectouse en HPLC-DAD. O método proporcionou unha boa exactitude e precisión, cumprindo así cos requisitos estipulados na lexislación da Unión Europea.

En este trabajo, se validó un método de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para la extracción de nueve triazinas en muestras de trucha. En las condiciones optimizadas, 0.2 g de muestra se dispersaron sobre 2 g de C18 y se transfirieron a un cartucho con ENVI-Carb-II/SAX/PSA (500/500/500 mg). La muestra dispersada se lavó con 10 mL de n-hexano y los analitos se eluyeron con 20 mL de acetato de etilo y 5 ml de acetonitrilo. El extracto se concentró hasta sequedad, se redisolvió en 1 mL de metanol y se inyectó en HPLC-DAD. El método proporcionó una buena exactitud y precisión, cumpliendo así con los requisitos estipulados en la legislación de la Unión Europea.

In this project, Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) has been validated for extraction of nine triazine in trout samples. Under optimised conditions, 0.2 g sample were dispersed using 2 g of C18, and transferred to a cartridge containing ENVI-Carb-II/SAX/PSA (500/500/500 mg). The dispersed sample was washed with 10 mL of n-hexane and analytes were eluted with 20 mL ethyl acetate and 5 mL acetonitrile. The extract was concentrated to dryness, re-constituted with 1 mL methanol and injected into the HPLC-DAD system. The method provided satisfactory accuracy and precision, meeting the requirements stipulated by European Union legislation.



1. Introducción.....	1
1.1 Triazinas. Estrutura e propiedades	4
1.2 Triazinas estudadas	8
1.2.1 Clorotriazinas.....	8
1.2.2 Metiltiotriazinas.....	12
1.3 Distribución das triazinas no medio ambiente.....	15
1.3.1 Evolución dos herbicidas no solo.....	15
1.3.2 Transporte á atmosfera.....	17
1.3.3 Transporte cara o medio acuático	17
1.4 Troita de acuicultura	19
1.5 Lexislación	20
1.6 Determinación de triazinas	21
1.6.1 Dispersión da matriz en fase sólida (MSPD).....	21
1.6.2 Métodos de concentración	22
1.6.3 Técnicas de separación	23
2. Obxectivos	25
3. Antecedentes.....	29
4. Proceso experimental.....	33
4.1 Materiais e equipos.....	35
4.2 Reactivos	35
4.3 Preparación de disolucións patrón.....	36
4.4 Mostras.....	36
4.5 Método de extracción.....	37
4.6 Lavado de material.....	38
4.7 Método cromatográfico.....	39
5. Resultados e discusións	41
5.1 Método cromatográfico.....	42
5.1.1 Identificación e cuantificación	42
5.1.2 Límites de detección e cuantificación	44
5.1.3 Precisión instrumental	45
5.2 Procedemento analítico.....	47
5.2.1 Ensaio preliminares.....	47



Índice

5.2.2 Validación.....	48
6. Conclusións	52
7. Bibliografía	58



1. Introducción

O crecemento da poboación mundial, así como a necesidade de abastecemento, levou ao sector agrícola a buscar métodos para aumentar a súa produtividade. Entre as actividades levadas a cabo para incrementar a produción cabe destacar o uso de praguicidas, cuxa función é erradicar as pragas responsables das cuantiosas perdas nas colleitas.

Enténdese como praguicida: “Calquera substancia ou mestura de substancias destinadas a previr, destruír ou controlar calquera praga, incluíndo os vectores de enfermidades humanas ou de animais, as especies non desexadas de plantas ou animais que causan prexuízo ou que interfíren de calquera forma na produción, elaboración, almacenamento, transporte ou comercialización de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos de madeira ou alimentos para animais, ou que poden administrarse aos animais para combater insectos, arácnidos ou outras pragas en ou sobre os seus corpos. O termo inclúe as substancias destinadas a utilizarse como reguladoras de crecemento das plantas, defoliantes, desecantes, axentes para reducir a densidade de froita ou axentes para evitar a caída prematura da froita, e as substancias aplicadas aos cultivos antes ou despois da colleita para protexer o produto contra o deterioro durante o almacenamento e transporte” (FAO, 2002).

Nas últimas décadas, o aumento no rendemento dos cultivos debido ao uso destas substancias fixo que acadaran un papel moi importante na agricultura moderna, tal é así que o simple feito de intentar obter resultados similares prescindindo da súa utilización sería impensable. É evidente que mediante o emprego de praguicidas conseguiuase producir alimentos dunha forma máis eficiente e economicamente rendible, pero a súa utilización a gran escala tamén trae consigo efectos negativos contra a saúde humana e o medio ambiente.

A procedencia e o tratamento que se lles da aos alimentos que se inxiren diariamente son aspectos que preocupan cada vez máis, consecuencia disto é que cada vez son máis os estudos que se levan a cabo para detectar contaminantes en alimentos e produtos alimenticios. De feito, na actualidade, realízanse moitos traballos de investigación para desenvolver métodos de análise de praguicidas en gran variedade de matrices. Entre estas cabe destacar os produtos pesqueiros, que son unha das principais fontes de alimentación do ser humano.

Segundo os datos proporcionados pola FAO, só en 2010 destináronse aproximadamente 128 millóns de toneladas de pescado para o consumo humano. Fronte a tales cantidades, e tendo en conta que unha grande parte dos contaminantes que hai no ambiente acaban chegando ao medio acuático e acumulándose nos organismos vivos, cabe dicir que é de especial interese desenvolver métodos de análise que determinen a presenza de praguicidas neste tipo de matrices. Destacar tamén, a importancia que ten a industria pesqueira na economía galega, feito que se evidencia nos máis de 80 núcleos de poboación nos que estas actividades son de grande importancia socioeconómica (<http://www.pescadegalicia.com/gl/pesca-fresca-e-marisqueo>). Así pois, o estudo destes contaminantes en pescados e produtos pesqueiros é de grande interese económico e medioambiental para Galicia.

1.1 Triazinas. Estrutura e propiedades

Os praguicidas pódense clasificar de diversas formas, unha delas é segundo o tipo de organismos que se quere controlar. Atendendo a este tipo de clasificación atopamos, entre outros, insecticidas, acaricidas, funguicidas, avicidas e herbicidas. Neste traballo estudaranse as triazinas, que pertencen ao grupo dos herbicidas, que son comunmente empregadas polo sector agrícola para combater o crecemento das malas herbas nos cultivos.

As triazinas son un tipo de herbicidas selectivos que están presentes nas 10 fórmulas máis utilizadas en Europa. Empréganse extensivamente como herbicidas pre- e post-emerxente tanto en pastos, como para o control das malas herbas en diferentes cultivos (*Wang et al., 2010*). Estes foron introducidos por J.R. Geigy cara os anos 50, e actualmente están considerados, aínda que en menor grao en comparación con outros praguicidas, medioambientalmente perigosos debido á súa persistencia, toxicidade, capacidade de bioacumulación e por ser disruptores endócrinos.

Quimicamente presentan unha estrutura heterocíclica análoga ao benceno, na que 3 átomos de carbono son substituídos por 3 átomos de nitróxeno. Esta substitución da lugar a tres isómeros estruturais: 1,3,5-triazina, 1,2,4-triazina e 1,2,3-triazina, cuxas estruturas se amosan na **figura 1.1**.

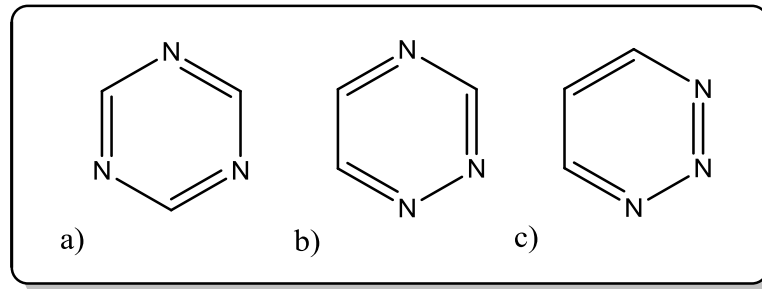


Figura 1.1 : Isómeros estruturais a) 1,3,5-triazina, b) 1,2,4-triazina, c) 1,2,3-triazina.

Dos tres isómeros, a 1,3,5-triazina tamén coñecida como *s*-triazina é a que presenta unha maior importancia. Esta é menos estable que o benceno debido a que a nube π do anel bencénico vese afectada pola introdución de átomos de N nas posición 1, 3 e 5, producíndose un aumento da densidade electrónica nestas posicións e a conseguinte diminución nas posicións 2, 4 e 6, facilitando deste xeito as reaccións de substitución nucleófila nestas últimas (*Pacáková et al., 1996*).

Para sintetizar a meirande parte dos herbicidas triazínicos emprégase a *s*-triazina, a cal se lle engade un substituínte nas posicións 2, 4 e 6 (**figura 1.2**).

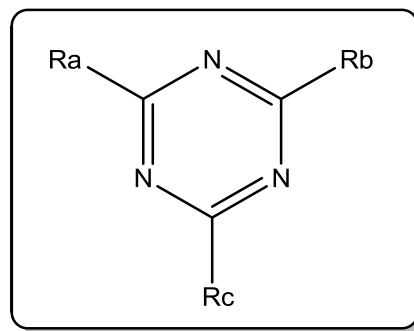


Figura 1.2 : Estrutura xeral da *s*-triazina substituída en 2, 4 e 6.

Normalmente introdúcese na posición 2 un grupo funcional metoxi ($-\text{OCH}_3$), tioalquil ($-\text{SCH}_3$) ou cloro (Cl), mentres que nas posicións 4 e 6 engádense grupos amino substituídos.

Propiedades Físico-Químicas dos derivados das s-triazinas

As propiedades físico-químicas que presentaran os derivados da s-triazina dependerán, fundamentalmente, da natureza do substituínte en a posición 2, ($-OCH_3$, $-SCH_3$ ou Cl). As propiedades dos cloro-derivados difiren considerablemente das dos tiometil- e metoxi-derivados, mentres que estes dous últimos compórtanse de xeito similar. Nas posicións 4 e 6 atópanse grupos amino substituídos que exercen unha influencia moito menor (*Pacáková et al., 1996*).

As triazinas son compostos de baixa polaridade, debilmente básicos, pouco solubles e estables tanto en fase sólida como en disolución. En medio acuoso poden existir en forma neutra ou protonada dependendo do pK_a do composto e do pH do medio (*Homer M. LeBaron et al., 2008*).

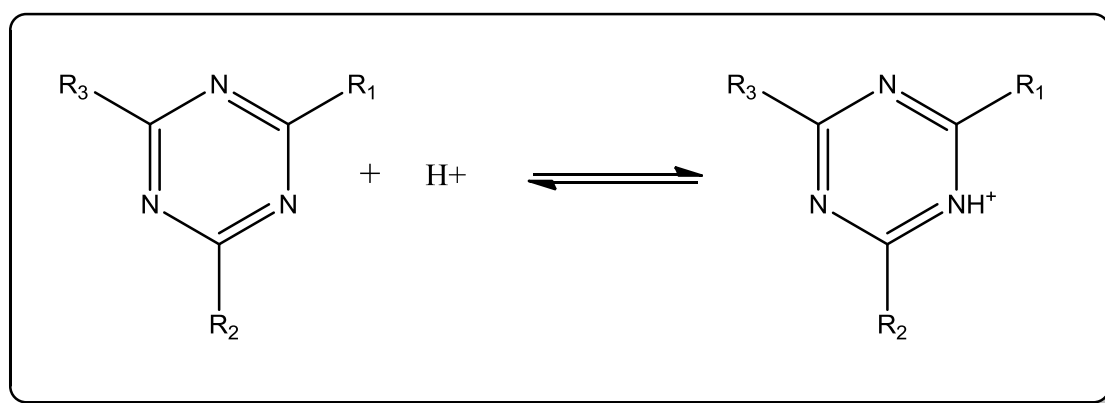


Figura. 1.3 : Reacción de protonación, onde R1= OCH_3 , SCH_3 ou Cl e R2 e R3 representan grupos amino substituídos.

- Solubilidade e Hidrólise.

Presentan un rango de solubilidade en auga (a $pH \sim 7$ e $20^\circ C$) de menos de 5 mg/l a máis de 3000 mg/l (*Homer M. LeBaron et al., 2008*). Este valor dependerá especialmente do substituínte que teña na posición 2, aumentando conforme á seguinte orde $SCH_3 < Cl < OCH_3$. Se aumenta a acidez do medio a solubilidade tamén o fará debido á protonación da molécula.

A hidrólise destas substancias prodúcese en disolucións fortemente ácidas ou básicas, especialmente a temperaturas elevadas.

- Propiedades ácido-base.

A basicidade destes compostos incrementase en función do substituínte que haxa na posición 2, seguindo esta orde $Cl < SCH_3 < OCH_3$ (*Pacáková et al., 1996*). As cloro-s-triazinas teñen uns valores de pK_a comprendidos entre 1.6 e 1.9, mentres que as metoxi-s-triazinas e as tiometil-s-triazinas teñen valores entre 4 e 4.8 (*Homer M. LeBaron et al., 2008*). Os substituíntes que se atopan nas posicións 4 e 6 afectan en menor grao a basicidade, pero esta incrementase co número crecente de átomos de hidróxeno do grupo amino substituído e co aumento da lonxitude e das ramificacións da cadea alquílica (*Pacáková et al., 1996*).

- Polaridade.

As s-triazinas son compostos que presentan unha baixa polaridade, pero o seu valor incrementase en función do substituínte da posición 2 de acordo á seguinte orde $SCH_3 < Cl < OCH_3$ (*Dopico-García, 2000*). Os substituíntes das posicións 4 e 6, que son normalmente grupos amino substituídos, fan que a polaridade da molécula diminúa a medida que aumenta a lonxitude da cadea alquílica.

- Fotólise.

A fotólise depende fortemente do substituínte da posición 2, diminuindo segundo a seguinte orde $OCH_3 > Cl > SCH_3$. Comparando a fotólise de triazinas que difiren só no substituínte da posición 4, vese que esta é independente da cadea alquílica que presentan os grupos amino (*Pacáková et al., 1996*).

- Absorción.

Gran parte das triazinas presentan unha absorción máxima en disolución acuosa comprendida entre 220 a 225 e/ou 250 nm, a súa magnitude verase afectada pola acidez da disolución. En metanol, no que a solubilidade é moito maior, os máximos de absorción cambian, sendo entre 265-270 nm para os cloro-derivados e entre 219-230 nm para os metoxi- e tialquil- derivados. (*Pacáková et al., 1996*).

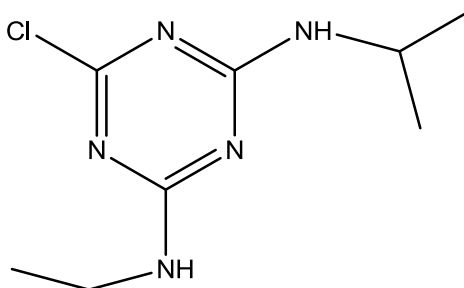
1.2 Triazinas estudadas

Neste traballo estudaranse nove triazinas, das cales cinco pertencen ao grupo das clorotriazinas (atrazina, cianazina, propazina, simazina e terbutilazina) e catro ao das metiltiotriazinas (ametrina, prometrina, terbutrina e simetrina). A continuación describiranse as características máis relevantes de cada unha delas.

1.2.1 Clorotriazinas

Atrazina

A atrazina é un herbicida pre- e post- emerxente rexistrado para o control de malezas de folla ancha e algunhas malas herbas. Usualmente emprégase en cultivos de millo e de caña de azúcar (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).



- < Fórmula: $C_8H_{14}ClN_5$
- < IUPAC: 2-cloro-4-etilamin-6-isopropilamin-s-triazina
- < Peso molecular: 215,7 g/mol
- < Abreviatura: CEIT

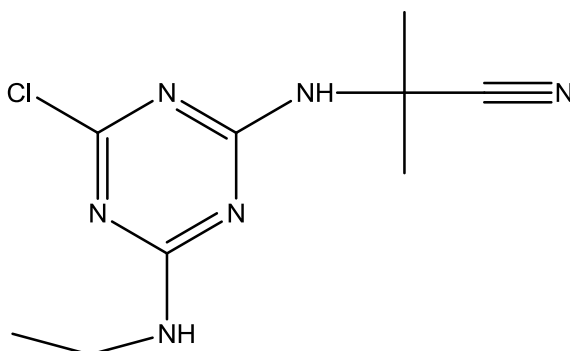
En canto á súa toxicidade, é practicamente non tóxica para as aves e os mamíferos, lixeiramente tóxica para os peixes de auga doce e moi tóxica para os invertebrados mariños (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>), presentando unha lixeira tendencia á bioacumulación en organismos acuáticos.

En xeral, a súa persistencia en solos é de 14 a 109 días, aínda que nalgúns pode persistir ata máis tempo (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).

En augas superficiais e subterráneas presenta unha vida media de máis de 6 meses cunha tendencia a unirse aos sedimentos.

Cianazina

É un herbicida pre- e post- emerxente empregado no control anual de herbas e malezas en plantacións de millo, algodón, sorgo, trigo e nas terras de cultivo en barbeito (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).



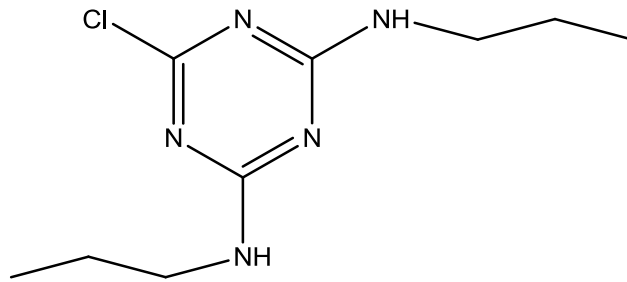
- < Fórmula: $C_9H_{13}ClN_6$
- < IUPAC: 2-(4-cloro-6-etilamin-[1,3,5] triazina-2- ilamin)-2-metilpropionitrilo
- < Peso molecular: 240,7 g/mol
- < Abreviatura: CCyET

É lixeiramente tóxica para as aves, peixes e invertebrados acuáticos. Presenta unha baixa persistencia no solo (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>), degradándose de forma rápida tanto en condicións aerobias como en anaerobias. Debido á súa mobilidade pode ser facilmente transportada ata as augas superficiais e subterráneas.

Propazina

A propazina é un herbicida selectivo que se utiliza para o control anual de gramíneas e maleza de folla ancha (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>), o cal se pode empregar antes do crecemento da maleza ou despois da súa eliminación.

Este composto é tóxico para os organismos acuáticos e é moderadamente persistente no solo, cunha vida media de 12 a 24 semanas nun terreo arxiloso non estéril e de 8 a 12 semanas nun terreo areoso estéril.



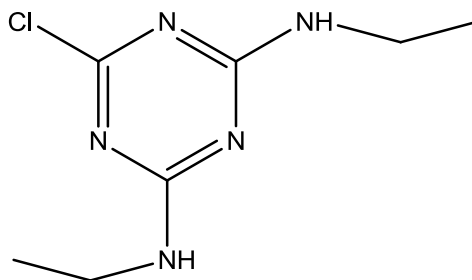
- ⟨ Fórmula: $C_9H_{16}ClN_5$
- ⟨ IUPAC: 6-cloro- N^2,N^4 -diisopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- ⟨ Peso molecular: 229,7 g/mol
- ⟨ Abreviatura: CIIT

Debido á súa mobilidade, ten unha alta probabilidade de filtrarse ás augas subterráneas e de chegar cara as augas superficiais por escorrentía (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).

Simazina

É un herbicida selectivo (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>) pre- e post-emerxente amplamente utilizado no control anual de gramíneas e maleza de folia ancha.

A simazina é practicamente non tóxica para os mamíferos, as aves e as abellas, moderadamente tóxica para os peixes de auga doce e altamente tóxica para os invertebrados de auga doce (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).



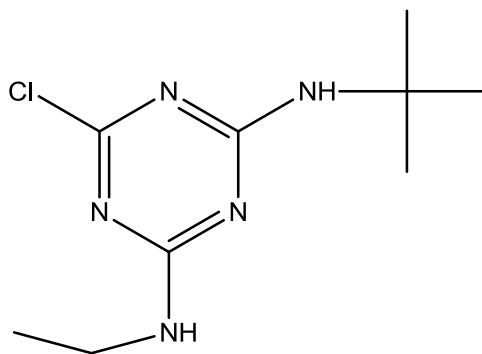
- ⟨ Fórmula: $C_7H_{12}ClN_5$
- ⟨ IUPAC: 6-cloro- N^2,N^4 -dietyl-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- ⟨ Peso molecular: 201,7 g/mol
- ⟨ Abreviatura: CEET

Estudos de laboratorio indican que a simazina é capaz de persistir durante meses no medio ambiente (vida media de 91 días), debido a que non é facilmente degradada polos organismos microbianos do solo. Os estudos realizados en medios acuáticos indican que esta presenta unha persistencia variable comprendida entre os 12 e os 700 días (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).

Terbutilazina

A terbutilazina é un alguicida que se emprega tanto para o control do fango producido polas algas, fungos e bacterias en sistemas de refrixeración de augas, estanques, fontes e acuarios (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>), así como para a súa actuación contra a maioría das malezas de folla ancha e gramíneas no cultivo de millo, caña de azúcar, plátano e piña.

Este composto é practicamente non tóxico para as aves, moderadamente tóxico para os peixes de auga fría e quente e lixeiramente para os invertebrados de auga doce (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>). En canto aos invertebrados mariños é altamente tóxico.



- < Fórmula: $C_9H_{16}ClN_5$
- < IUPAC: N²-terc-butil-6-cloro-N⁴-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- < Peso molecular: 229,7 g/mol
- < Abreviatura: CBET

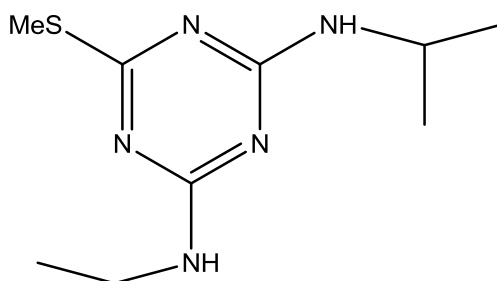
A terbutilazina é estable á hidrólise e á fotólise, degradándose moi lentamente nos sistemas acuáticos en condicións aerobias, polo que a súa persistencia será elevada na maioría destes. (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).

1.2.2 Metiltiotriazinas

Ametrina

Este herbicida utilízase para o control das malas herbas de folla ancha e gramíneas (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>) en campos de millo, piña e caña de azúcar.

A ametrina é lixeiramente tóxica para os mamíferos, aves, insectos, peixes e invertebrados de auga doce, e moderadamente tóxica para os peixe e invertebrados mariños (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).

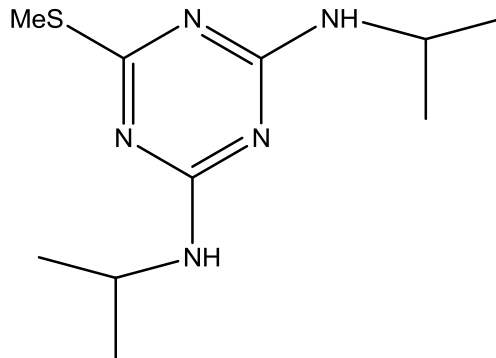


- < Fórmula: $C_9H_{17}N_5S$
- < IUPAC: N²-etil-N⁴-isopropil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- < Peso molecular: 227,3 g/mol
- < Abreviatura: SEIT

A súa mobilidade varia en función das propiedades e do tipo de solo no que se aplica, sendo a súa principal vía de degradación o metabolismo aerobio do solo, cunha vida media de 9 a 38 días (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>). É estable á hidrólise cunha vida media observada de 368 días.

Prometrina

A prometrina é un herbicida que se emprega no control anual de diversas gramíneas e malezas de folla ancha (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>), tanto en cultivos de alimentos como de algodón.



- < Fórmula: $C_{10}H_{19}N_5S$
- < IUPAC: N,N'-diisopropil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- < Peso molecular: 241,4 g/mol
- < Abreviatura: SIIT

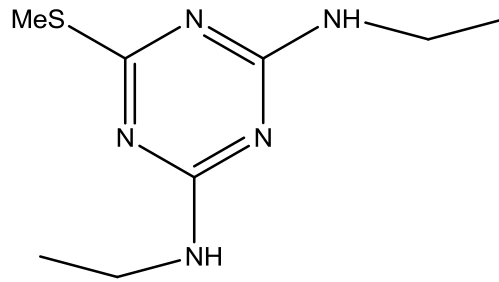
Este composto é practicamente non tóxico para as abellas e para as aves (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>), lixeiramente tóxico para os mamíferos pequenos e invertebrados de auga doce, e moderadamente tóxico para os peixes.

En canto á mobilidade, a prometrina ten un alto potencial de filtración cara as augas subterráneas (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>), presentando gran mobilidade en solos areosos e alcalinos que conteñan pouca materia orgánica e arxila.

Simetrina

A simetrina é un herbicida selectivo pre- e post- emerxente eficaz contra as malas herbas e gramíneas (<http://www.pesticidechem.com>) en cultivos de millo, trigo, arroz, caña de azúcar, plátano e piña.

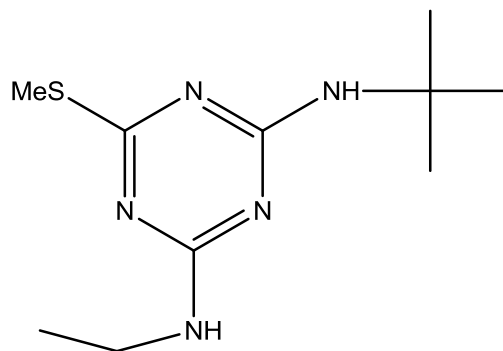
Considérase lixeiramente tóxico para os crustáceos e peixes. Descomponse en condicións de altas temperaturas e hidrólizase en medios fortemente ácidos ou básicos. (<http://www.pesticidechem.com>).



- < Fórmula: $C_8H_{15}N_5S$
- < IUPAC: N², N⁴-dietil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- < Peso molecular: 213,3 g/mol
- < Abreviatura: SEET

Terbutrina

A terbutrina é un herbicida selectivo pre- e post- emerxente, eficaz contra a maioría das malas herbas en cultivos de trigo, cebada, caña de azúcar, chícharos e patacas. Tamén se emprega como herbicida acuático para o control de malezas e algas en encoros e estanques (<http://www.pesticidechem.com>).



- < Fórmula: $C_{10}H_{19}N_5S$
- < IUPAC: N²-terc-butil- N⁴-etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- < Peso molecular: 241,4 g/mol
- < Abreviatura: SETT

Este herbicida é lixeiramente tóxico para as aves e moderadamente tóxico para os peixes. Absórbese facilmente en solos cun alto contido orgánico ou arxiloso, tendo unha vida media de 14 a 28 días. Debido a que é lixeiramente móbil ou inmóbil non tende a filtrarse. Non é volátil en auga, absórbese nos sedimentos e nas partículas en suspensión sendo a súa degradación e hidrólise lenta.

1.3 Distribución das triazinas no medio ambiente

O uso indiscriminado destes herbicidas fai que se atopen en solos, froitas e verduras pero tamén na auga, pois, debido a que posúen unha baixa adsorción no solo e unha elevada solubilidade en auga, a súa migración cara estas vese favorecida (*Andreu & Picó, 2004*). O ciclo hidrolóxico leva estes contaminantes ata o mar, consecuencia disto é que a biota mariña se ve afectada. Ademais hai que ter en conta que os sistemas costeiros teñen pouca capacidade para degradalos (*Fernández et al., 2013*).

Unha vez que se aplica o herbicida sobre o cultivo ou campo de cultivo, usualmente en forma líquida ou de spray, unha fracción do mesmo pode evaporarse ou dispersarse no medio ambiente sendo por tanto unha ameaza para os diversos ecosistemas e a saúde pública.

Intentar comprender tódolos mecanismos implicados no devir das triazinas unha vez incorporadas ao medio pode resultar moi complexo, xa que a súa evolución depende de varios factores tales como a natureza química de cada composto e as propiedades físico-químicas e biolóxicas do solo no que se atopen. Neste apartado intentarase explicar dunha forma sinxela os procesos que fan posible que estas substancias cheguen aos distintos compartimentos ambientais.

1.3.1 Evolución dos herbicidas no solo

Cando un herbicida entra en contacto co solo vai estar suxeito a fenómenos que conducen á súa retención, transformación e transferencia.

- Retención

É un proceso que inmoviliza, máis ou menos tempo, as moléculas dos herbicidas e os seus produtos de degradación impedindo o seu movemento. Entre os fenómenos físico-químicos que conducen á retención, o que se observa con maior frecuencia é a adsorción. Este é un fenómeno de superficie que dá lugar a acumulación das especies químicas na interfase de dúas fases non miscibles. A capacidade de retención que presenta un solo dependerá principalmente do seu contido en materia orgánica e inorgánica, da humidade e do pH (*Raoul Calvet et al., 2005*).

- Transformación

Trala súa incorporación ao solo, as moléculas dos herbicidas poden sufrir diferentes transformacións químicas que modifican a súa estrutura e composición. Estes cambios poden estar limitados á eliminación ou substitución dun grupo funcional, á transformación en novos produtos ou á mineralización completa do praguicida (*Raoul Calvet et al., 2005*).

As reaccións químicas responsables da degradación destas substancias poden ser de natureza abiótica e biótica.

- I. Degradación abiótica. Débese a reaccións químicas catalizadas por sistemas enzimáticos, entre as cales se distinguen:
 - a) Reaccións de hidrólise.
 - b) Reaccións de combinación.
 - c) Reaccións fotoquímicas.
 - d) Reaccións de oxidación-redución.

- II. Degradación biótica. É o resultado da acción de diversos organismos vivos; prodúcese en entornas naturais como o solo, os sedimentos e a auga, pero tamén pode ocorrer en organismos vexetais e animais. Cando a degradación se produce en organismos vivos fálase de procesos de detoxificación, pero as reaccións químicas involucradas son xeralmente da mesma natureza.

- Transferencia.

Os herbicidas que entran en contacto co solo, como consecuencia dos tratamentos que se lle dan aos cultivos, son transferidos a outros compartimentos ambientais. Estes movementos teñen lugar a distancias e velocidades variables, dependendo das propiedades de cada composto, da estrutura do solo e do réxime hidrodinámico. Isto tradúcese nunha dispersión do praguicida, permitindo a súa incorporación polos organismos vivos, pero tamén se poden transportar lonxe do lugar onde se aplicou, chegando deste xeito á atmosfera e ás augas superficiais e subterráneas (*Raoul Calvet et al., 2005*).

1.3.2 Transporte á atmosfera

Os praguicidas que permanecen no solo despois da súa aplicación pasan á atmosfera por evaporación ou sublimación, dependendo de se se atopan en estado líquido ou sólido. A volatilización de cada composto virá determinada, entre outros factores, pola presión de vapor, a temperatura ambiente e o contido en auga do solo no que se atopan.

Dependendo da humidade do solo, prodúcese diferentes fenómenos de transporte que contribúen á volatilización dos compostos. Para solos secos e hidratados que non están saturados de auga a difusión molecular é a que contribúe en maior medida ao proceso, mentres que nos solos hidratados e saturados o transporte por convección é o que favorece a volatilización (*Raoul Calvet et al., 2005*).

Outra forma de entrada á atmosfera é a través da auga e das partículas. Estas substancias poden estar disoltas na auga, e poden ser incorporadas á atmosfera a través do ciclo hidrolóxico. Como se comentou anteriormente, estes compostos poden quedar retidos na materia particulada do solo, os cales poden ser transportados á atmosfera como consecuencia da erosión do vento (*Raoul Calvet et al., 2005*).

1.3.3 Transporte cara o medio acuático

O vector de transporte responsable da maior parte da transferencia de residuos de herbicidas cara as augas subterráneas e superficiais é a propia mobilidade da auga no ciclo hidrolóxico.

A contaminación química das augas superficiais representa unha ameaza, non só para a saúde humana senón tamén para o medio mariño, xa que se produce unha acumulación no ecosistema acuático, causando toxicidade aguda e crónica nos organismos que habitan nel dando lugar a perdas de biodiversidade (*Raoul Calvet et al., 2005*).

- Augas superficiais.

A contaminación das augas superficiais, así como a dos organismos vivos que habitan nelas, prodúcese fundamentalmente a través da escorrentía superficial, que consiste no transcurso da auga, procedente principalmente da choiva, a través da superficie terrestre. Os praguicidas, presentes nas capas superficiais do solo e nos cultivos, poden ser arrastrados polo fluxo destas augas xunto coa materia particulada que os conteñen, desprazándose ata as augas continentais. Ademais, da mesma forma que os pesticidas se incorporan á atmosfera mediante a evaporación da auga, estes poden incorporarse de novo a través da precipitación seca e húmida (*Raoul Calvet et al., 2005*).

- Augas subterráneas.

Os herbicidas chegan ata as augas subterráneas mediante a lixiviación, que é o proceso mediante o cal a auga, procedente da choiva ou da rega, arrastra ou dissolve as moléculas do herbicida dando lugar a un movemento a través do solo. Consecuencia disto é que os residuos dos praguicidas chegan ás augas subterráneas. O transporte por lixiviación depende da intensidade e da frecuencia da auga aportada, da capacidade de retención dos materiais que contén o solo que atravesa e da estrutura do mesmo (*Raoul Calvet et al., 2005*).

Outra forma de transporte cara as augas subterráneas é a través da asociación de macromoléculas orgánicas. As moléculas dos pesticidas poden estar asociados a macromoléculas ou partículas coloidais inorgánicas ou orgánicas, presentes na estrutura do solo, que favorecen o seu transporte cara as profundidades. Esta asociación reduce a solubilidade destes compostos, facilitando deste xeito o seu transporte a través da infiltración da auga (*Raoul Calvet et al., 2005*).

Por todo o exposto, dende o mesmo momento que entran ao medio, as triazinas están expostas a fenómenos de transporte, mediante os cales poden chegar ao medio acuático podendo acumularse nos peixes a través das membranas biolóxicas, por contacto con auga contaminada ou a través da ingestión de alimentos ou sedimentos que conteñan estes residuos.

1.4 Troita de acuicultura

A acuicultura é unha boa alternativa para garantir o abastecemento e consumo de pescado a nivel mundial. Ademais os peixes cultivados en criadeiros non están expostos aos diversos contaminantes presentes nos ecosistemas acuáticos. Pero, pódese garantir que estes produtos non presentan contaminantes? Aínda que a resposta máis obvia sexa un sí, a realidade é que non, xa que os residuos de praguicidas poden chegar a acumularse nos seus organismos a través da súa alimentación e do medio.

a) Acumulación a través da alimentación.

Os peixes de acuicultura aliméntanse con pensos fabricados con vestixios de peixes de pouco valor comercial tamén coñecidos como peixe forraxe. A medida que se incrementa a produción acuícola tamén o fai a captura deste tipo de peixe, polo que a presión pesqueira que se exerce sobre estas especies estase incrementando, causando serias perturbacións na cadea trófica que alteran a sustentabilidade e a produtividade doutras especies mariñas (*Stanford University, 2009*).

Para levar a cabo unha acuicultura máis sostible e que non dependa tanto dos recursos mariños, introducíronse pensos elaborados con produtos vexetais producidos polo sector agrícola. Estes produtos de orixe vexetal poden levar residuos de praguicidas, os cales poden acabar acumulándose nos peixes a través da alimentación.

b) Acumulación a través do medio.

Xeograficamente, os criadeiros sóense atopar en zonas próximas a explotacións agrarias, polo que os praguicidas empregados para cultivar as terras poden ser transportados a través do medio cara estas zonas. Ademais, estes residuos pódense atopar a longas distancias da zona onde foron aplicados debido á súa mobilidade e ao transporte, tal é como se comentou no apartado anterior, polo que as augas dos criadeiros teñen unha certa probabilidade de contaminarse.

A realidade é que a sociedade pode estar consumindo peixe de acuicultura contaminado con residuos de praguicidas, polo que resulta interesante analizar este tipo de produtos co fin de garantir a seguridade alimentaria. Por este motivo, para levar a cabo este estudo escolleuse a troita como matriz. Este é un peixe pertencente a

familia dos salmónidos, cuxas características físicas varían en función da especie da que se trate. En canto á súa hábitat, poden vivir en auga doce ou salgada.

Este tipo de pescado pode consumirse durante todo o ano, xa que a meirande parte do que se comercializa provén de acuicultura. A acuicultura é un sector que está medrando enormemente e cobrando gran importancia, como consecuencia da diminución das capturas e o aumento da demanda mundial de peixe. Tal é así que, segundo o informe do World Bank titulado *Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture*, calcúlase que case dous terzos dos produtos mariños que comeremos en 2030 serán producidos por acuicultura.

1.5 Lexislación

Os beneficios acadados polo sector agrícola debido ao uso de praguicidas é innegable, pero tamén xurdiron certos problemas derivados destes, entre os cales cabe destacar a contaminación medioambiental. A pesar dos inconvenientes que presentan, dificilmente se pode prescindir do seu uso tal e como está desenvolvida a agricultura moderna. Ante este feito, é necesario establecer unha agricultura sostible, conservando os recursos naturais e contaminando o mínimo posible. Para iso é necesario regular o seu uso, establecendo os límites máximos que poden acadar estas substancias nos distintos ecosistemas.

As primeiras directivas nas que aparecen lexislados os herbicidas en augas son a *Directiva 80/778/CE do 15 de Xullo de 1980* e a *Directiva 98/83/CE do 3 de Novembro de 1998 relativas á calidade da auga de consumo humano*, nas que se establece un límite para cada praguicida de 0.10 µg/L e para o total de praguicidas 0.50 µg/L, onde están incluídos, entre outros, os herbicidas orgánicos.

Máis adiante, a *Directiva 2000/60/EC do parlamento Europeo e do Consello do 23 de Outubro do 2000* coñecida como Directiva Marco da Auga, establece un marco comunitario de actuación no ámbito da política de augas, a cal fixa unha estratexia para loitar contra a contaminación desta, esixindo novas medidas específicas de control da contaminación. De acordo a esta Directiva, a avaliación do ecosistema acuático implica a estimación da calidade da auga e dos organismos biolóxicos. Posteriormente aparece a *Decisión nº 2455/2001/CE do Parlamento Europeo e do*

consello do 20 de novembro de 2001 pola cal se aproba a lista de substancias prioritarias no ámbito da política de augas, modificando así a Directiva 2000/60/CE, na que se inclúen por primeira vez a atrazina e a simazina.

Actualmente está en vigor a Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeo e do consello do 16 de decembro de 2008 relativa ás normas de calidade ambiental no ámbito da política de augas. Nela establécense os niveis máximos en augas naturais para 33 substancias ou grupos de substancias prioritarias e outros contaminantes químicos, entre os que se atopan a atrazina e simazina. Para estes compostos establécese unha concentración máxima admisible (CMA) en augas superficiais de 2 µg/L para a atrazina e 4 µg/L para a simazina. Recentemente, a terbutrina foi engadida á listaxe de substancias prioritarias (*Commision Proposal 2011/876/EC*).

Seguindo a mesma liña, a Directiva Marco de Estratexia Mariña 2008/56/CE establece entre os descritores de boa saúde ambiental que “as concentracións de contaminantes se atopen en niveis que non dean lugar a efectos de contaminación e que os contaminantes presentes en pescado e outros produtos pesqueiros dirixidos ao consumo humano non superen os niveis establecidos pola normativa comunitaria.”

A lexislación Europea aínda non ten establecidos os límites máximos de residuos de triazinas en organismos acuáticos, sen embargo a FDA (Food and Drug Administration) ten establecido un nivel de tolerancia de 12 mg/Kg para a simazina en pescados (*Food and Drug Administration, 2011*).

1.6 Determinación de triazinas

1.6.1 *Dispersión da matriz en fase sólida (MSPD)*

Dende que fose desenvolvida por Barker en 1989, a dispersión da matriz en fase sólida (MSPD) acadou un papel moi importante na extracción de pesticidas, (*Gaunt et al., 2000; Tseng et al, 2004; Rodríguez-González et al., 2014*). A MSPD consiste basicamente en dispersar a mostra de forma homoxénea sobre un soporte sólido, xerando así unha nova fase con propiedades específicas, a cal se introduce nunha columna, e a continuación os analitos de interese son illados mediante elución cun disolvente orgánico.

Nesta técnica, a mostra (líquida, sólida ou semisólida) introdúcese nun morteiro de vidro e mestúrase cun axente dispersante (adsorbente), co obxectivo de conseguir unha completa trituración e dispersión da mostra sobre o dispersante. Unha vez completada a destrución e a dispersión da mostra, a mestura resultante transfírese a unha columna e compáctase. Polo miúdo, sobre todo en mostras biolóxicas, na parte inferior da columna colócase unha capa de adsorbente, xeralmente de distinta natureza que o sólido utilizado para dispersar a mostra, co fin de conseguir unha maior limpeza do extracto.

Finalmente, as substancias de interese elúense empregando un disolvente axeitado, sendo a polaridade deste un factor moi importante á hora de determinar os analitos que elúen do cartucho e en que orde o fan. En canto ao tipo de elución hai dúas posibilidades. Na primeira delas, os analitos son retidos na columna e as interferencias son eliminadas. Unha vez eliminadas, estes son eluídos con outro disolvente. Na segunda, as interferencias retéñense selectivamente na columna e os compostos de interese son directamente eluídos (*Kristenson et al., 2006*).

Para a extracción de contaminantes en matrices orgánicas, a MSPD presenta unha alta flexibilidade e selectividade debido á gran variedade de combinacións de adsorbentes e disolventes de elución que se poden empregar. Ademais, é unha técnica sinxela que permite realizar nun mesmo paso a separación das interferencias dos analitos cun alto rendemento consumindo unha baixa cantidade de disolventes.

1.6.2 Métodos de concentración

En análise de trazas a concentración dos analitos soe estar por debaixo dos límites de detección ou cuantificación do equipo instrumental co que se realizará a detección, polo que na maioría dos casos é necesario realizar unha concentración antes de realizar a medida.

O rotavapor é un aparato de uso común en calquera laboratorio, mediante o cal se pode realizar unha evaporación rápida dun disolvente por destilación ao baleiro. É importante coñecer o punto de ebulición do disolvente que se vai eliminar para non sobrequentar nin quentar demasiado pouco o baño de auga. Debido a que un gran número de compostos orgánicos son volátiles, a eliminación do disolvente mediante

evaporación por quentamento pode producir perdas dos analitos, polo tanto, durante esta operación non se procede á eliminación total do disolvente, senón que se leva ata a gota para evitar posibles perdas por evaporación ou descomposición. Como a eliminación total do disolvente non se pode realizar mediante quentamento, a evaporación completa deste pode conseguirse burbullando unha suave corrente de $N_{2(g)}$. Este proceso resultaría tedioso se tiveran que eliminar volumes elevados, pero ao reducir a meirande parte do disolvente no rotavapor esta etapa resulta rápida.

1.6.3 Técnicas de determinación

Transcorrido todo o proceso de extracción, o seguinte paso é levar a cabo a análise dos analitos mediante a técnica adecuada. A cromatografía de gases (GC) e a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), son as técnicas máis empregadas na determinación analítica de herbicidas triazínicos. Neste traballo utilizarase a cromatografía líquida de alta resolución.

Como xa se comentou na **sección 1.1**, as triazinas posúen propiedade ácido-base e son relativamente polares, de modo que a súa separación mediante cromatografía de líquidos debe realizarse en columnas de fase inversa (RP), con fases móbiles de elevada polaridade. Dentro das columnas de fase inversa, unha das máis usadas na separación destes compostos son as C18 (*Portugal et al., 2008; Rodríguez-González et al., 2014*). En canto aos disolventes de elución, sóense usar mesturas metanol-auga e acetonitrilo-auga (*Beale et al., 2009; Brix et al., 2009*).

O mecanismo de separación en RP-HPLC baséase na distribución do soluto entre a fase móbil e a estacionaria, e esta dependerá do carácter hidrofóbico ou hidrofílico que teña o composto. As triazinas presentan ambos caracteres, os cales están especialmente separados (o anel é hidrofílico e as cadeas aminoalquílicas das posicións 4 e 6 son hidrofóbicas). Empregando unha elución en gradiente de acetonitrilo-auga (*Beceiro-González et al., 2012*), conséguense obter unha boa separación das 9 triazinas obxecto de estudo, ademais de acurtar a duración do proceso. Partindo dunha composición inicial de fase móbil de elevada polaridade conséguense eluir as moléculas menos hidrofóbicas (maior polaridade), mentres que as máis hidrofóbicas (menor polaridade) quedarán retidas na fase estacionaria.

Para lograr a elución secuencial dos analitos máis apolares, vaise diminuindo a polaridade da fase móbil mediante a adición gradual de disolvente orgánico.

Trala separación os compoñentes pasan polo detector, o cal produce un sinal eléctrico proporcional á cantidade de materia. Como sistema de detección pódese utilizar un detector de rede de díodos (*Mendas et al., 2001*), o cal é axeitado para a determinación de triazinas xa que estes compostos presentan grupos cromóforos, ou ben un detector de masas (*Ferrer & Thurman, 2007*). Este último é un detector universal, moi útil para obter información cualitativa dos compostos e confirmar a súa identidade. A utilización dun espectrómetro de masas como detector non están ao alcance de tódolos laboratorios debido ao seu elevado custe, polo que a separación e detección se realizará adaptándose aos equipos dispoñibles de cada laboratorio.

Neste traballo o sistema de detección que se utilizará será unha rede de díodos. Este detector ten a capacidade de rexistrar simultaneamente o sinal a diferentes lonxitudes de onda, proporcionando o espectro da disolución que atravesa a célula de detección, permitindo extraer o espectro UV de cada composto. Isto da a posibilidade dunha dobre identificación, permitindo confirmar a existencia dun composto con maior rigor.

2.

Obxectivo

Os herbicidas triazínicos son compostos orgánicos de grande interese analítico, xa que constitúen un dos grupos de herbicidas máis empregados a nivel mundial. Actualmente están considerados perigosos para o medio ambiente debido á súa persistencia, toxicidade e capacidade de bioacumulación. Incluso a baixas concentracións, resultan tóxicos para o home e os organismos vivos, razón pola cal se consideran contaminantes prioritarios e a lexislación é cada vez máis exixente en canto ás cantidades máximas admisibles en mostras ambientais e en alimentos.

A conservación e o uso sostible do medio mariño constitúen factores importantes de cara á prosperidade económica, ao benestar social e á calidade de vida. Debido a que a avaliación do ecosistema acuático implica a estimación da calidade da auga e dos organismos biolóxicos (Directiva Marco Europea), a avaliación destes contaminantes en pescados é de grande importancia. Tamén compre destacar que o consumo de produtos pesqueiros en Galicia presenta unha relevancia de primeiro orde, polo que é de grande interese o desenvolvemento e validación de métodos de análise sensibles a estos compostos en ditas matrices.

O obxectivo principal deste traballo será levar a cabo a validación dun método efectivo, sinxelo e rápido para a extracción e determinación simultánea de nove herbicidas triazínicos en pescados. O método, previamente desenvolvido no departamento de Química Analítica da Universidade da Coruña para mostras de mexillón, basease no uso da dispersión da matriz en fase sólida (MSPD), seguido dunha etapa de concentración e determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de rede de diodos (HPLC- DAD).

3. Antecedentes

O número de substancias e contaminantes que necesitan ser monitorizados está continuamente en aumento, así como tamén a diminución dos niveis aos cales necesitan ser determinados. Debido á gran variedade de matrices nas que se poden atopar estes contaminantes a nivel traza, nos últimos anos xurdiron novos procedementos que permiten a súa extracción en matrices complexas.

As triazinas son compostos orgánicos que se poden atopar nun gran número de matrices biolóxicas, tanto de orixe vexetal como animal, e representan un perigo potencial para o medio ambiente e para a saúde humana. Entre os métodos de extracción máis empregados para a determinación destes compostos en mostras de orixe animal atópanse a extracción con disolventes, tales como a axitación (*Tsuda et al., 2009*), o soxhlet (*Rosenblum, et al., 2001*), a sonicación (*Carafa et al., 2007*), a enerxía de microondas (*Fernández et al., 2013*) e a extracción con disolventes a alta presión (PLE) (*Damásio et al., 2010*). Estas técnicas consomen unha grande cantidade de disolvente, e ademais, na maioría dos casos é necesaria unha etapa previa de purificación para diminuír a presenza de interferentes no extracto final.

Coma unha alternativa á extracción con disolventes, nos últimos anos desenvolvéronse técnicas de extracción en fase sólida, as cales consisten en preconcentrar e illar os analitos da matriz sobre un soporte sólido. Entre estas, atópanse a extracción en fase sólida (SPE), a microextracción en fase sólida (SPME) e a extracción con barra de axitación magnética (SBSE). Estas técnicas son axeitadas para extraer contaminantes en mostras líquidas, pero presentan certas limitacións cando se aplican a matrices sólidas e semisólidas. Estas limitacións poden ser emendadas mediante o emprego da dispersión da matriz en fase sólida (MSPD), método sinxelo e barato que reduce o consumo de disolventes orgánicos, mellora a eficiencia da extracción e elimina os pasos adicionais de limpeza e preconcentración das mostras.

En MSPD, a eficiencia e a selectividade da extracción vai depender de varios factores, tales como o material dispersante, o co-adsorbente e a natureza dos disolventes empregados.

Na actualidade existe unha grande variedade de materiais que poden ser utilizados como axentes dispersantes. Entre os máis empregados atópanse os soportes de sílica enlazados a grupos funcionais orgánicos, tales como o octil-silano (C8) (*Barker, 2000; Kruve et al., 2008*) e o octadecil-silano (C18) (*Barker, 2007; Dantas-Silva et al., 2008;*

Souza-Caldas et al., 2013). Neste tipo de adsorbentes, as partículas de sílice actúan como disgregantes axudando á ruptura das membranas celulares, mentres que as cadeas alquílicas enlazadas solubilizan os compoñentes da matriz sobre a súa superficie (*García-López et al., 2008*). Ademais, teñen a vantaxe de posuír grupos silanois non enlazados, tanto na superficie das partículas como nos poros, que interaccionan coa auga da mostra actuando a súa vez como axente desecante. No caso de tecidos vexetais, os dispersantes máis utilizados son o C8 e o C18, mentres que en tecidos animais, ao conter un maior porcentaxe graxo, o que máis se emprega é o C18. Con este tipo de material é posible obter extractos relativamente libres de graxa para mostras de fígado (*Crescenzi et al., 2001*), músculo (*Kubala-Drinic et al., 2003*), ril (*Ruiz et al., 2005*) e pescados graxos (*Pensado et al., 2005*).

Outros dispersantes empregados, aínda que con menor frecuencia, son os materiais non enlazados, como a sílica xel, o florisil ou alúmina. As interaccións que presentan este tipo de adsorbentes cos compoñentes da mostra son exclusivamente de adsorción, e evidentemente, non son capaces de disolver a matriz da mostra.

En matrices complexas, é habitual recorrer ao uso de co-adsorbentes na parte inferior da columna para obter extractos máis limpos. Cando se utiliza C18 ou C8 como dispersante, a sílica (*Navarro et al., 2002*) a alúmina (*Abhilash et al., 2007*), e o florisil (*Dantas-Silva et al., 2008; Fang et al., 2009*) son os co-adsorbentes máis utilizados para a extracción de pesticidas en vexetais e froitas. En canto a matrices de orixe animal, unha das maiores dificultades que se atopa é conseguir un bo fraccionamento entre as especies de interese e a elevada cantidade de ácidos graxos que presentan. Co fin de acadar unha maior limpeza nos extractos, nos últimos anos incrementouse de xeito considerable o uso de cartuchos multicapa, onde cada capa cumpre un papel específico na eliminación de compostos interferentes.

Un destes cartuchos multicapa, o cal se empregou na análise de triazinas en mostras de mexillón (*Rodríguez-González et al., 2015*), é o ENVI-Carb-II/SAX/PSA. Este está composto por tres capas, onde o ENVI-Carb-II (carbón activo), presenta grande afinidade por moléculas planas e retén os pigmentos e esteroides presentes habitualmente en alimentos e produtos naturais. A PSA (fase polimérica enlazada de etilendiamina-N-propil que contén aminas primarias e secundarias) ten unha forte afinidade e gran capacidade de reter ácidos graxos, ácidos orgánicos, azúcares e algúns pigmentos polares. A SAX é unha fase de intercambio iónico que contén unha

amina cuaternaria, a cal serve para extraer ácidos débiles e outros compostos cunha ou máis cargas negativas. Esta diminúe a presenza de compostos que absorben na rexión ultravioleta, proporcionando extractos máis limpos e polo tanto unha maior sensibilidade.

No que respecta aos eluíntes, os disolventes máis empregados en MSPD para a extracción de triazinas en mostras biolóxicas son o diclorometano (Tseng et al., 2004), o acetonitrilo (Ferrer et al., 2005; Souza-Caldas et al., 2013), o acetato de etilo (Ramos et al., 2009; Wen et al., 2012), así como unha mestura destes dous últimos (Rodríguez-González et al., 2015). Nos últimos anos o uso do diclorometano decaeu considerablemente, conforme aos principios da Química Verde, por tratarse dun disolvente clorado.

Debido as vantaxes que ofrece a MSPD, esta técnica é amplamente empregada na extracción de residuos de diferentes praguicidas en tecidos, tanto de orixe vexetal como animal. Non obstante, no que respecta ás triazinas, son moi poucas as referencias que se atopan na literatura empregando este tipo de extracción.

4. Proceso experimental

4.1 Materiais e equipos

- Balanza analítica, precisión 0.0001 g. AND, modelo ER-180.
- Bomba de baleiro e presión. Millipore, modelo WP6122050.
- Bomba de baleiro e presión. Rocker, modelo 300.
- Filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de tamaño de poro 0.45 μm e diámetro 13 mm. Teknokroma.
- Baño calefactor. Büchi, modelo B-490.
- Homoxeneizador. Omni-Mixer, modelo 17106.
- HPLC. Waters, modelo 2695 equipado con:
 - Bomba cuaternaria.
 - Columna analítica: Hypersil GOLD (C18) 150 x 4.6 mm, 5 μm .
 - Detector de fotodiodos (DAD) modelo 996.
 - Forno para columna.
 - Inxector automático.
 - Procesador de datos Empower. Versión 2.0.
- Liofilizador. Labconcor[®], modelo LYPH.LOCK 6 con compresor de aire respirable de alta presión Junior II. Bauer.
- Material de uso común no laboratorio (probetas, funís, matraces, vaso de precipitados, pipetas pasteur, viais...)
- Micropipetas Eppendorf de 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL e 500-5000 μL .
- Morteiro e mazo de vidro.
- Muíño eléctrico. Moulinex.
- Rotavapor. Büchi, modelo R-200.
- Sistema distribuidor de baleiro Visiprep[®]. Supelco.
- Ultrasóns. J.P. Selecta, modelo ultrasons-H.

4.2 Reactivos

- Acetato de etilo para análisis instrumental. Panreac.
- Acetonitrilo, calidade gradiente HPLC. Merck.
- Auga Milli-Q (resistividade específica = 18 M Ω /cm).

- Cartuchos 12 mL triple capa ENVI™-Carb-II/SAX/PSA (500/500/500 mg) para SPE. Supelco.
- Deterxente alcalino sólido DERQUIM LA 13. Panreac.
- Metanol 205, calidade gradiente HPLC. Merck.
- Patróns sólidos individuais de novetriasinas: Ametrina, Atrazina, Cianazina, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina e Terbutilazina. Sigma-Aldrich.
- n-Hexano 98 %. Merck.
- Supelclean LC18. Supelco.

4.3 Preparación de disolucións patrón.

A partir das disolucións individuais de 1000 µg/mL das nove triazinas, almacenadas a 18°C, prepárase en metanol un patrón mestura que contén unha concentración de 10 µg/mL de cada triazina. Tódalas disolucións de traballo prepáranse diariamente partindo da disolución patrón de 10 µg/mL e diluíndo en metanol as correspondentes cantidades.

4.4 Mostras

A matriz empregada neste estudo foi a troita asalmonada (*Salmo trutta*) procedente de acuicultura. As mostras (aproximadamente 1 kg) foron adquiridas nunha cadea de supermercados da cidade de A Coruña.

Para levar a cabo a análise substráese só o tecido, prescindindo de vísceras, pel e espiñas. O tecido muscular córtase en anacos e homoxeinízase no Omni-mixer para a súa posterior liofilización. A mostra liofilizada, que se observa na **figura 4.1**, tritúrase nun muíño eléctrico co fin de obter un po homoxéneo, o cal se almacena nun frasco ámbar ata a súa posterior análise. O contido en auga da mostra determinouse gravimetricamente por diferenza de pesada antes e despois do proceso de liofilización.



Figura 4.1: Mostra de troita asalmonada liofilizada.

4.5 Método de extracción

A extracción mediante dispersión da matriz en fase sólida levouse a cabo seguindo o procedemento desenvolvido no Departamento de Química Analítica para a análise de triazinas en mexillóns (*Rodríguez-González et al, 2015*), cunha lixeira modificación na masa da mostra. Este método emprega C18 como dispersante, ENVI™-Carb-II/SAX/PSA como co-adsorbentes e unha mestura de acetato de etilo e acetonitrilo como disolvente de elución.

Tanto o soporte sólido como os co-adsorbentes necesitan unha etapa previa de limpeza, a cal serve para eliminar as posibles substancias interferentes que poidan ter, evitando así que o eluato se contamine. No caso do C18, lávase con acetato de etilo durante 30 min nun baño de ultrasóns, e posteriormente acondiciónase con metanol do mesmo xeito. A continuación, o disolvente decántase e déixase secar con corrente de nitróxeno durante 2 h; transcorrido ese tempo gárdase nun frasco de vidro ámbar nun desecador. En canto aos co-adsorbentes, inmediatamente antes da súa utilización lávanse con hexano, acetato de etilo e acetonitrilo, deixando secar os cartuchos durante 10 min.

O método de extracción empregado consiste en homoxeneizar 0.2000 g de mostra liofilizada con 2.00 g de Envi-C18 nun morteiro de vidro durante 5 minutos. A mestura final transfírese a un cartucho de triple capa ENVI™-Carb-II/SAX/PSA (500/500/500 mg) conectado a un sistema de baleiro Visiprep®, e lávase con 10 mL de hexano. A continuación os analitos son eluídos con 20 mL de acetato de etilo e 5 mL de acetonitrilo. Na **figura 4.2** ilústrase o procedemento de extracción levado a cabo.

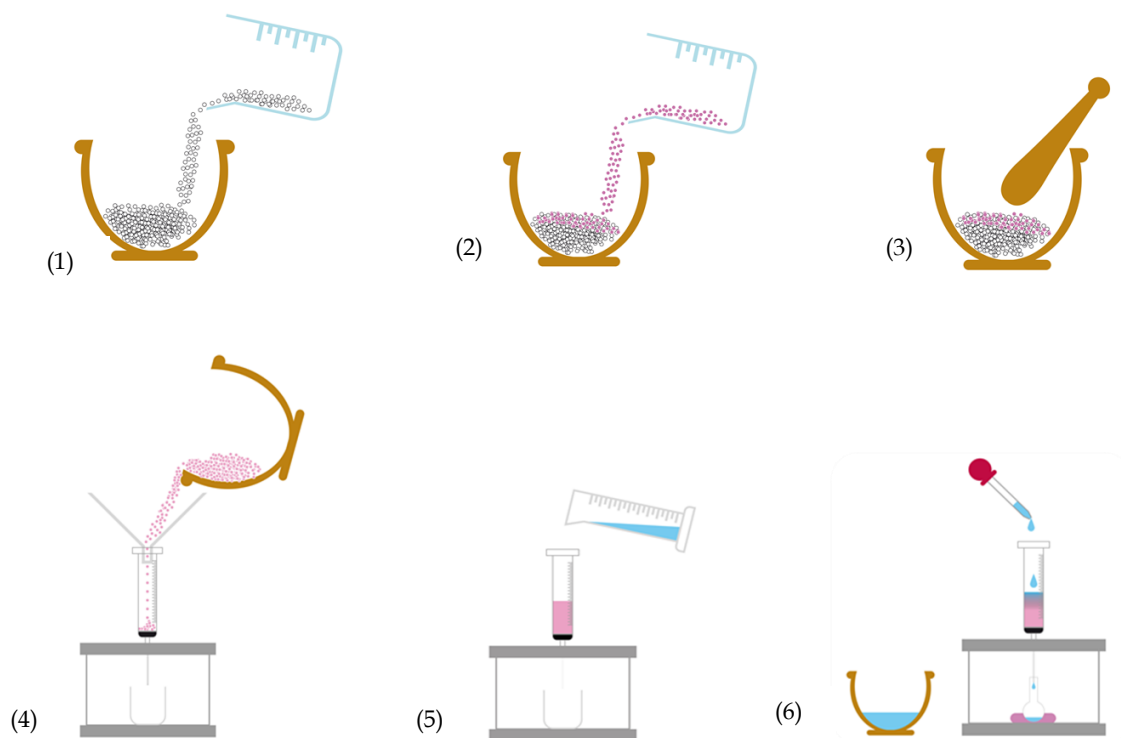


Figura 4.2: Proceso de extracción mediante MSPD, onde: (1) 2 g C18, (2) 2 g C18 + 0.2 g mostra, (3) Homoxeneización, (4) Transvase, (5) Lavado 10 mL n-hexano, (6) Elución 20 mL acetato de etilo e 5 mL acetonitrilo.

Seguidamente o eluato obtido evapórase ata a gota no rotavapor e lévase a sequeidade en corrente de nitróxeno. Finalmente, o residuo redisólvese en 1 mL de MeOH e fíltrase a través dun filtro PTFE de 0.45 μm directamente nun inxerto, contido dentro dun vial para a súa análise cromatográfica.

4.6 Lavado de material

Ao traballar con compostos orgánicos a niveis traza, calquera fonte de contaminación que se poida ter durante o proceso é de gran importancia para o devir da análise, polo que hai que ter especial coidado coa limpeza do material empregado. Por este motivo, todo o material de vidro utilizado someterase a un protocolo de limpeza, o cal consiste

en enxaugar abundantemente con auga antes de mergullalo nunha disolución acuosa dun deterxente alcalino sólido durante 48 horas. No caso de non dispoñer de material, o tempo de permanencia no xabón alcalino será de 1 hora en baño de ultrasóns. Por último aclárase con auga do grifo e con auga Milli-Q.

4.7 Método cromatográfico

Neste traballo utilízase o método cromatográfico desenvolvido no departamento de Química Analítica da Universidade da Coruña (*Beceiro-Gonzalez et al., 2012*), que emprega como fase móbil un gradiente de acetoniitrilo-auga e detección con rede de diodos. O gradiente empregado amósase na **táboa 4.1**. O fluxo da fase móbil é de 1 mL/min e o volume de inxección que se usa é de 20 μ L.

Táboa 4.1: Gradiente empregado para a separación cromatográfica das nove triazinas

Tempo (min)	Acetonitrilo (%)	Auga (%)
0	30	70
8	30	70
13	40	60
18	50	50
23	40	60
27	30	70
30	30	70

Como sistema de detección utilízase un detector de fotodiodos de barrido (DAD), o cal nos permite medir simultaneamente en todo o rango de lonxitudes de onda seleccionado, podendo obter os espectros UV de cada un dos picos cromatográficos obtidos. Deste xeito, non só se poden identificar os compostos comparando tempos de retención, senón que tamén se obtén información cualitativa sobre a estrutura a través dos espectros UV, permitindo determinar se debaixo dos picos elúe unha única substancia ou máis. A absorbancia medíuse continuamente nun rango de 200 nm a 400 nm, e a cuantificación realizouse a 222.7 nm co fin de acadar a máxima sensibilidade.

5. Resultados e discusiones

5.1 Método Cromatográfico

5.1.1 Identificación e cuantificación

Unha vez finalizada a separación cromatográfica, é necesario realizar a identificación dos compostos de interese. Esta realizarase comparando os tempos de retención da mostra cos dun patrón sometido ás mesmas condicións. Con este parámetro cualitativo non podemos afirmar con certeza a presenza do analito, xa que un pico que aparentemente se corresponde co analito pode deberse a outra substancia cuxo tempo de retención é similar. A modo de exemplo, na **figura 5.1** amósase o cromatograma correspondente a unha disolución patrón de 1 µg/mL coas nove triazinas, analizado baixo as condicións descritas na sección 4.7. Como se pode observar, a igualdade de lonxitude da cadea alquílica nas posicións 4 e 6, as clorotriazinas elúen antes que as metiltiotriazinas. Por outra banda, a medida que aumenta a lonxitude da cadea alquílica nesas posicións o composto queda máis retido na fase estacionaria.

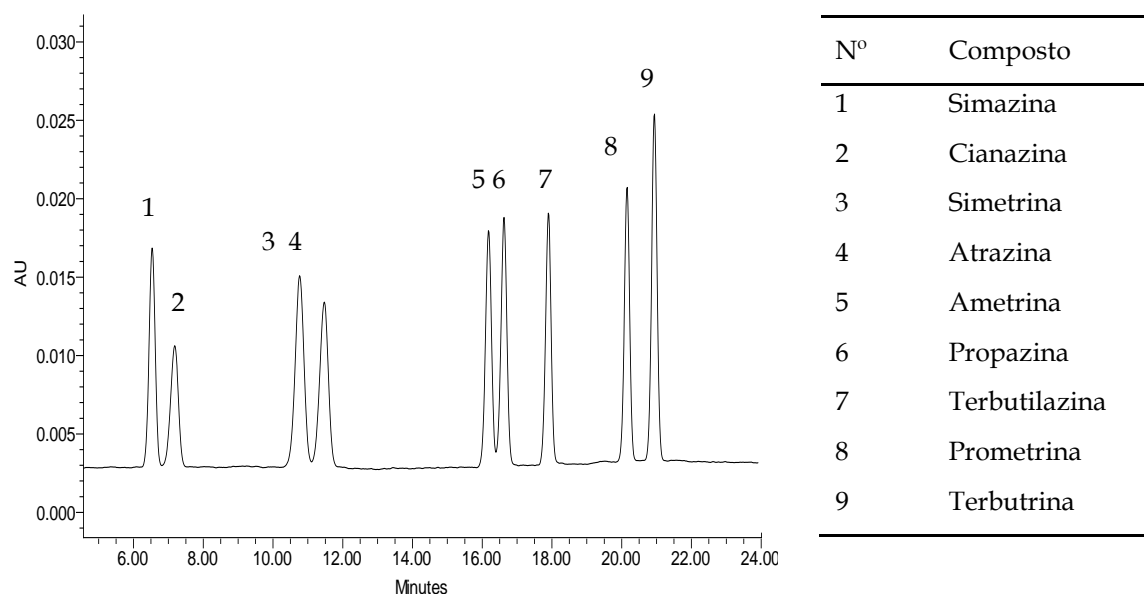


Figura 5.1: Cromatograma dunha disolución patrón de 1 µg/mL.

Para confirmar que os picos obtidos se corresponden coas triazinas estudadas, recurriremos aos espectros UV que nos proporciona o detector acoplado ao HPLC. Na **figura 5.2** recóllense os espectros resultantes de tódalas especies analizadas, entre os cales é doado distinguir os dous grupos de triazinas estudados.

A familia das metiltiotriazinas (ametrina, prometrina, simetrina e terbutrina) presenta un só máximo en torno a 220-224 nm, o cal é característico das triazinas, mentres que as clorotriazinas (atrazina, cianazina, propazina, simazina e terbutilazina), ademais de ter este máximo característico, presentan un segundo máximo ao redor dos 260 nm.

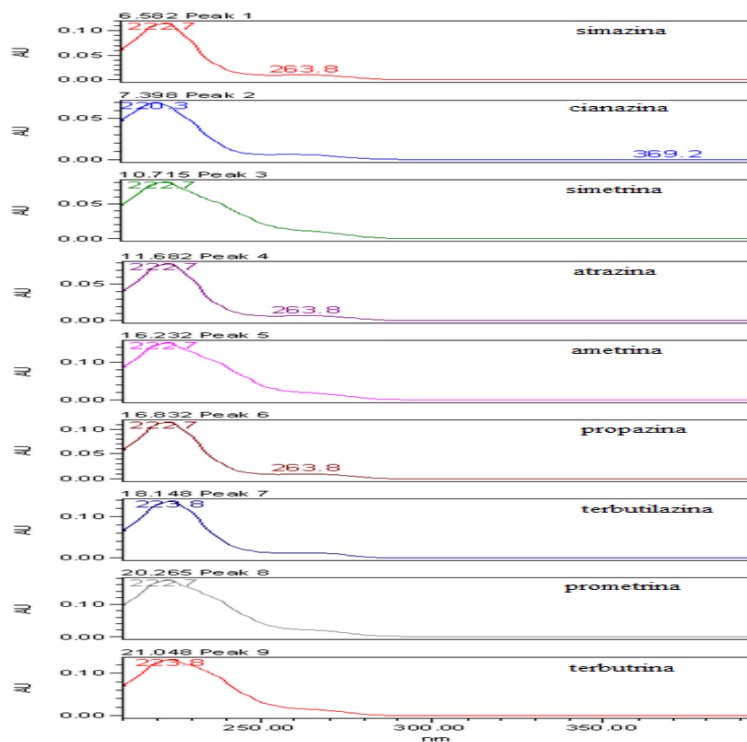


Figura 5.2: Espectros UV obtidos mediante un detector DAD.

Á hora de abordar a análise cuantitativa, o compoñente que vai ser cuantificado ten que estar perfectamente separado e identificado. Para levar a cabo a cuantificación dos analitos, realizarase a medida das áreas dos picos de cada composto a través dun programa especializado (Empower).

As curvas de calibrado obtéñense a partir dunha serie de disolucións patrón comprendidas entre 0.05 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$, sendo os valores intermedios: 0.1, 0.25, 0.5, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Cada punto prepárase diluíndo en metanol a correspondente cantidade dunha disolución patrón de 10 $\mu\text{g/mL}$ que contén as nove triazinas obxecto de estudo. Inxéctase 3 veces cada nivel de concentración, e cos datos obtidos represéntanse as áreas de cada triazina individual en función da concentración, facendo un axuste lineal mediante mínimos cadrados.

Na **figura 5.3** amósanse as curvas de calibrado obtidas para as diferentes triazinas estudadas, indicándose as ecuacións correspondentes. Á vista dos resultados obsérvase que tódalas curvas de calibrado amosan unha boa linealidade, con coeficientes de determinación superiores ao 0.9998.

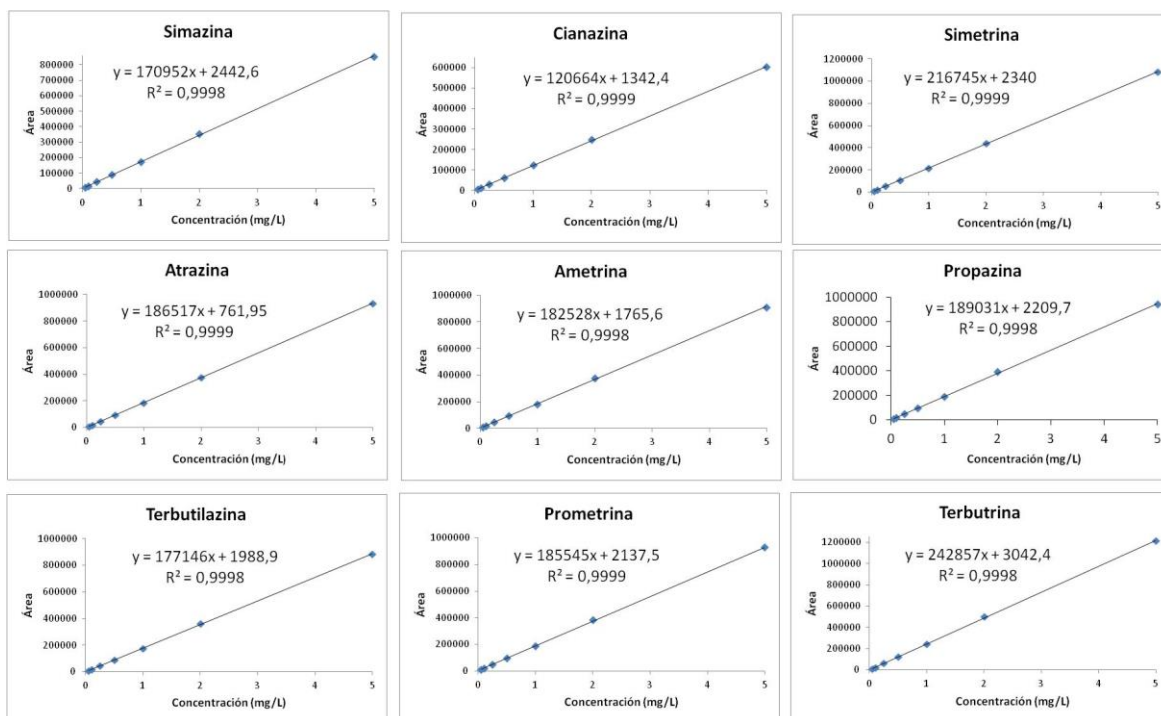


Figura 5.3: Curvas de calibrado de cada triazina individual.

5.1.2 Límites de detección e cuantificación

Segundo a IUPAC, o límite de detección (LDD) defínese como a mínima concentración ou masa de analito que xera un sinal que non pode ser confundido coa dun branco a un nivel de confianza do 99%.

O límite de cuantificación (LDC) defínese como a mínima concentración ou masa de analito que xera un sinal que non pode ser confundida coa dun branco, e que ademais se pode cuantificar de forma fiable (99.999 %).

Neste traballo calcularanse a partir do calibrado das disolucións patrón, empregando os blancos de calibrado. As fórmulas utilizadas son as seguintes:

$$LDD = \frac{Y + 3DE}{m}$$

$$LDC = \frac{Y + 10DE}{m}$$

Y = valor medio do branco

DE = desviación estándar asociada ao branco

m = pendente da recta de calibrado

Os límites instrumentais da medida (LDD e LDC), calculados segundo as fórmulas descritas anteriormente, amósanse na **táboa 5.1**.

Táboa 5.1: Límites de detección e cuantificación instrumentais

Composto	LDC ($\mu\text{g/mL}$)	LDC ($\mu\text{g/mL}$)
Simazina	0.008	0.021
Cianazina	0.011	0.029
Simetrina	0.005	0.013
Atrazina	0.006	0.015
Ametrina	0.014	0.039
Propazina	0.014	0.038
Terbutilazina	0.015	0.041
Prometrina	0.016	0.043
Terbutrina	0.012	0.033

5.1.3 Precisións instrumental

A precisión é unha medida do erro aleatorio ou indeterminado, e defínese como o grao de concordancia mutua entre os datos que se obteñen dunha mesma forma. Cando a dispersión dos datos é pequena, a precisión é boa e os parámetros de calidade relacionados con ela terán valores pequenos. Para levar a cabo o estudo da precisión do método cromatográfico avalíouse a repetibilidade e a reproducibilidade.

A repetibilidade dunha medida é o grao de concordancia entre dous ou máis resultados obtidos da mesma mostra, executados polo mesmo instrumento e operador nun mesmo laboratorio e nun curto período de tempo. O seu estudo realizouse inxectando 10 veces consecutivas unha disolución patrón das nove triazinas, a dous niveis de concentración, 0.05 µg/mL e 1 µg/mL.

En canto á reproducibilidade, é o grao de concordancia entre dúas ou máis medidas da mesma mostra pero de alícuotas diferentes, diferente operador, diferente instrumento, diferente laboratorio, sometidas a un mesmo tratamento ao longo dun período de tempo. Esta, ao igual que a repetibilidade, determinouse a dous niveis pero inxectando os patróns en diferentes días ao longo dunha semana.

Na **táboa 5.2**, amósanse os valores de repetibilidade e reproducibilidade, expresados como desviación estándar relativa (RSD). Como se pode observar, os valores obtidos para o nivel máis alto de concentración foron inferiores a 1.04 % para a repetibilidade e 1.92 % no caso da reproducibilidade. No que respecta ao nivel baixo, os valores de desviación estándar relativa foron inferiores a 1.77 % e a 3.58 % para a repetibilidade e reproducibilidade respectivamente.

Táboa 5.2: Repetibilidade e reproducibilidade instrumental expresada en % RSD.

Composto	Repetibilidade en % RSD		Reproducibilidade en % RSD	
	0.05 µg/mL	1 µg/mL	0.05 µg/mL	1 µg/mL
Simazina	1.77	0.76	2.10	0.97
Cianazina	0.92	1.04	3.58	1.92
Simetrina	0.56	0.77	0.67	0.87
Atrazina	0.98	0.78	0.66	0.56
Ametrina	0.66	0.54	0.88	1.52
Propazina	1.60	0.49	2.48	1.10
Terbutilazina	1.02	0.42	3.10	1.16
Prometrina	0.45	0.60	1.12	0.47
Terbutrina	0.60	0.53	0.62	1.16

5.2 Procedemento analítico

5.2.1 Ensaio preliminares

Os ensaios preliminares foron levados a cabo seguindo o procedemento descrito na sección 4.5, pero partindo de 0.5000 g de mostra seguindo o método desenvolvido previamente no departamento de Química Analítica para mostras de mexillón. Unha vez que os eluatos foron evaporados no rotavapor, observouse que os extractos obtidos presentaban unha grande cantidade de graxa, o que implica que as cantidades de adsorbentes empregadas non son suficiente. Isto pode explicarse pola diferenza no contido graxo de ámbalas dúas matrices, xa que a troita contén máis do dobre de graxa (4.8 g de graxa por cada 100 g de peixe) có mexillón (2.2 g de graxa por 100 g de bivalvo) (*Centre D'ensenyament Superior de Nutrició I Dietètica, 2008*). Ante este feito, decídese aumentar a 3.00 g a cantidade de C18, pero a pesar de que tras levar a sequidade o extracto presenta menor contido graxo, aínda se observa unha grande cantidade nas paredes do matraz.

Debido a que unha variación grande nas condicións do método considerado implicaría optimizar de novo as variables (tipo e cantidade de adsorbentes e eluíntes), decidiuse manter as condicións de extracción de partida, variando unicamente as cantidades de mostra. Os seguintes ensaios realizáronse empregando 0.2500 g de troita liofilizada. Neste caso non se observa residuo graxo durante o proceso de evaporación nin no de redisolución. Non obstante, unha vez filtrado o extracto, ao axitar o vial, tal e como se mostra na **figura 5.4**, aprécianse pequenas partículas de graxa en suspensión, polo que o extracto non pode ser analizado.



Figura 5.4: Extracto con partículas de graxa en suspensión.

A continuación reduciuse a cantidade de mostra ata 0.2000 g. Neste caso observouse que tralo procedemento completo os extractos quedan o suficientemente limpos como para poder ser inxectados no cromatógrafo (**figura 5.5**).

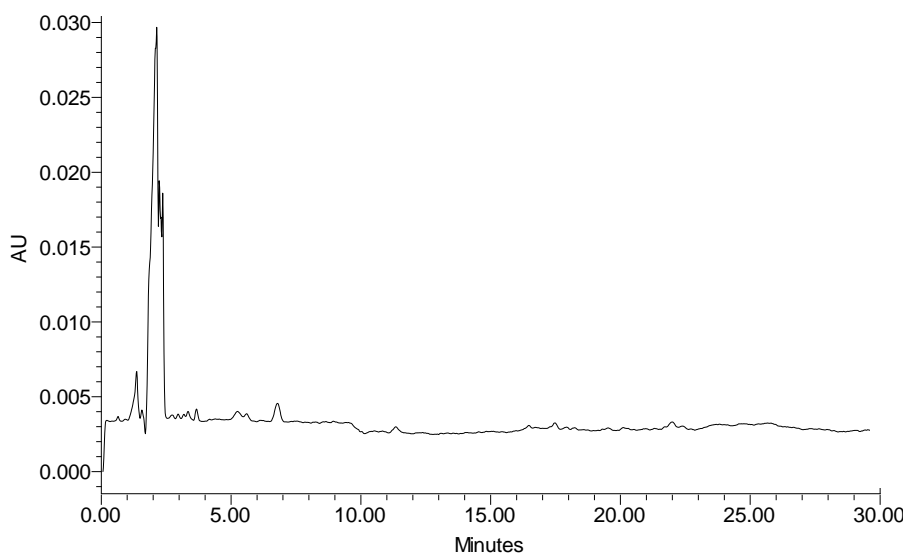


Figura 5.5: Cromatograma da mostra sen sobrecargar.

5.2.2 Validación

O método foi validado en termos de exactitude, precisión e límites de cuantificación (LDC) de acordo aos criterios e parámetros establecidos na Guía SANCO para métodos de validación e procesos de control de residuos de praguicidas en alimentos e pensos (*Directorate of General Health and Consumer Protection. Document nº SANCO/12571, 2013*).

A exactitude e a precisión do método determináronse mediante a análise de 0.2000 g de mostra de troita non contaminada, sobrecargando cun patrón de triazinas a dous niveis de concentración, 0.5 mg/kg e 5 mg/kg de mostra liofilizada (equivalente a 0.125 e 1.250 mg/kg de mostra fresca). Na **figura 5.6**, recóllense os cromatogramas obtidos para cada nivel de fortificación.

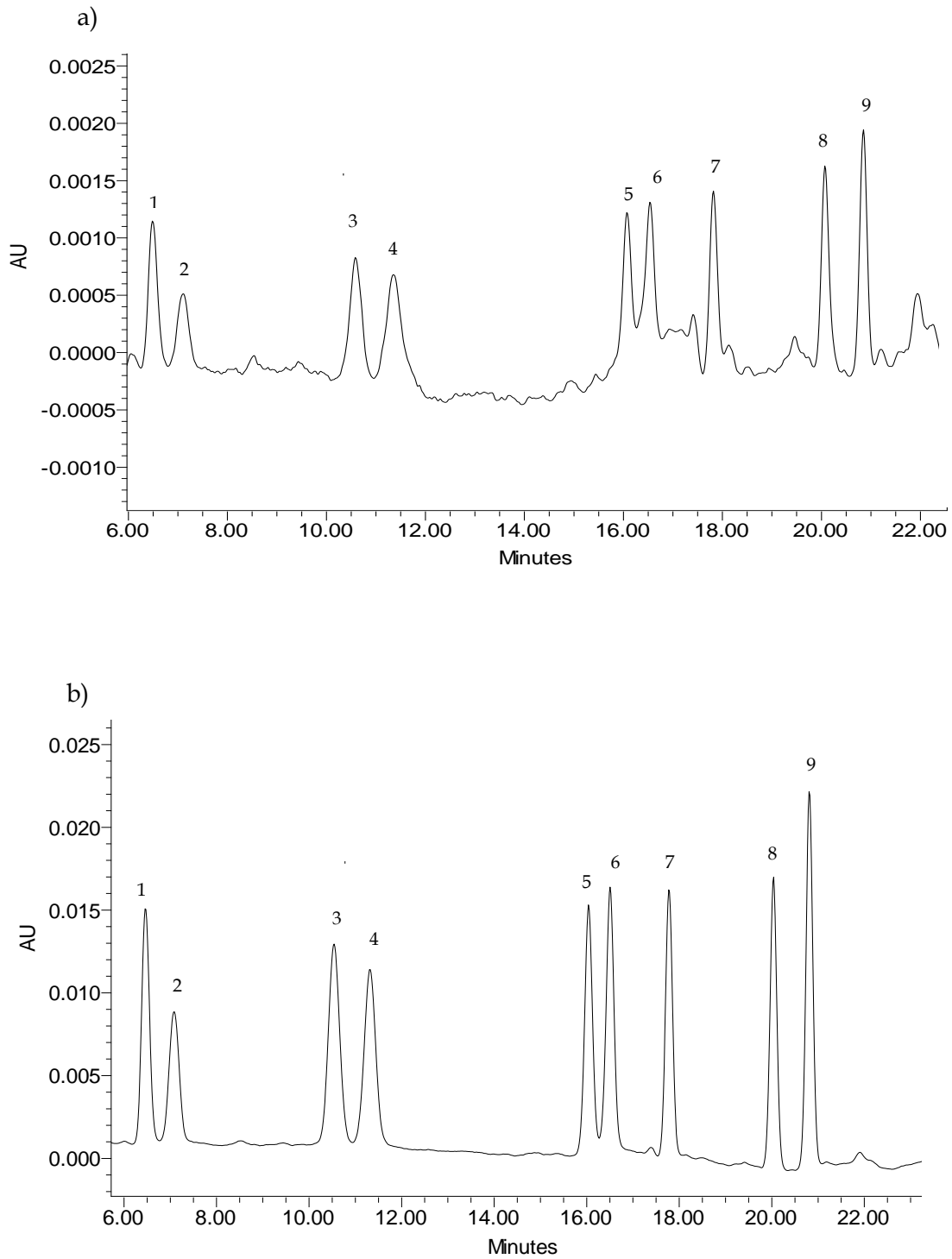


Figura 5.6: Cromatogramas mostra sobrecargada a) 0.5 mg/kg e b) 5 mg/kg , onde (1) Simazina, (2) Cianazina, (3) Simetrina, (4) Atrazina, (5) Ametrina, (6) Propazina, (7) Terbutilazina, (8) Prometrina, (9) Terbutrina.

A exactitude avalíase mediante o ensaio de recuperación, analizando cinco réplicas a cada nivel de fortificación. En canto á precisión do método, ao igual que a precisión instrumental, avalíase en termos de repetibilidade e reproducibilidade. A repetibilidade estudouse medindo 5 réplicas nun mesmo día, e a reproducibilidade fíxose con 6 réplicas en 3 días consecutivos. Os resultados obtidos para ambos estudos amósanse na **táboa 5.3**.

Táboa 5.3: Resultados correspondentes ao estudo da exactitude e precisión do método.

Composto	^(a) Recuperación (%)		^(b) Repetibilidade en % RSD		^(b) Reproducibilidade en % RSD	
	0.5 mg/kg	5 mg/kg	0.5 mg/kg	5 mg/kg	0.5 mg/kg	5 mg/kg
Simazina	90	97	3.83	1.39	7.94	6.19
Cianazina	105	98	5.86	1.52	8.20	5.89
Simetrina	90	97	6.69	2.02	12.70	3.87
Atrazina	101	99	4.93	2.53	10.20	4.97
Ametrina	96	96	4.53	2.30	12.90	5.90
Propazina	101	98	8.64	1.65	7.54	4.54
Terbutilazina	88	100	6.70	1.37	8.60	5.86
Prometrina	95	100	3.81	1.09	8.30	5.06
Terbutrina	100	100	4.71	1.61	4.70	5.91

^(a)n = 5 , ^(b)n = 5 e n = 6 para a repetibilidade e reproducibilidade respectivamente.

Segundo os criterios establecido na DG SANCO/12571/2013, para obter uns valores de recuperación promedio aceptables, estes teñen que atoparse entre o 70 e o 120 %. Como se pode observar na **táboa 5.3**, conséguense uns valores satisfactorios para tódalas triazinas, comprendidos entre o 88 e o 105 % para o nivel máis baixo de fortificación e entre o 96 e o 100 % para o nivel alto.

En canto á precisión, os valores obtidos foron altamente satisfactorios para o nivel máis alto de fortificación, oscilando entre o 1.5 % e o 2.5 % para a repetibilidade e entre o 3.9 % e 6.2 % no caso da reproducibilidade. No que respecta ao nivel baixo de sobrecarga, os valores de desviación estándar relativa foron inferiores ao 8.6 % e ao 12.9 % para a repetibilidade e reproducibilidade respectivamente. En tódolos casos os

valores obtidos para cada triazina foron inferiores ao 20 %, cumprindo deste xeito cos requisitos estipulados na Guía Europea de Control de Calidade (DG SANCO/12571/2013).

O documento SANCO (DG SANCO/12571/2013) define o límite de cuantificación (LDC) do método como o nivel máis baixo de concentración de analito validada con unha exactitude e precisión aceptables (recuperacións comprendidas entre o 70 % e 120 %, e RSD \leq 20 % para tódolos compostos). Neste estudo, o nivel máis baixo validado foi 0.5 mg/kg, o cal cumpre cos criterios estipulados anteriormente, polo tanto este corresponderíase co LDC do método

6. Conclusiones

Validouse un método para a determinación simultánea de nove herbicidas triazínicos (ametrina, atrazina, cianazina, prometrina, propazina, simazina, simetrina, terbutilazina e terbutrina) en mostras de troita. O procedemento basease no uso da dispersión da matriz en fase sólida (MSPD) como método de extracción, seguido dunha etapa de concentración e determinación mediante HPLC-DAD.

O método de extracción, desenvolvido previamente para mostras de mexillón, tivo que ser modificado con respecto á cantidade de mostra para poder ser aplicado. Nas condicións finais, 0.2 g de mostra liofilizada dispersáronse sobre 2 g de C18 e transferíronse a un cartucho con ENVI-Carb-II/SAX/PSA (500/500/500 mg). A continuación, a mostra dispersada lavouse con 10 mL de n-hexano, e os analitos eluíronse con 20 mL de acetato de etilo e 5 mL de acetonitrilo. Finalmente, o extracto concentrouse a sequidade, redissolveuse en 1 mL de metanol e analizouse mediante HPLC-DAD.

A validación do método foi levada a cabo dacordo aos criterios establecidos no documento SANCO/12571/2013 para métodos de validación e procesos de control de residuos de pesticidas en alimentos e pensos. A exactitude e precisión do método avalíouse a dous niveis de concentración, 0.5 mg/kg e 5 mg/kg. As recuperacións obtidas son satisfactorias para tódolos compostos, con valores comprendidos entre 88-105 % e entre 96-100 % para o nivel máis baixo e alto respectivamente. En canto á repetibilidade e a reproducibilidade, os valores de desviación estándar relativa foron inferiores ao 13 % para ambos casos.

Por todo isto, pódese concluir que o método é adecuado para a determinación simultánea das nove triazinas en mostras de troita. Cómpre destacar que a extracción mediante MSPD presenta grandes vantaxes fronte ás técnicas convencionais, xa que é un unha técnica sinxela, rápida, de baixo custo, cun menor consumo de disolventes orgánicos e de requirimentos enerxéticos de acordo os principios da Química Verde.

Se ha validado un método para la determinación simultánea de nueve herbicidas triazínicos (ametrina, atrazina, cianazina, prometrina, propazina, simazina, simetrina, terbutilazina y terbutrina) en muestras de trucha. El procedimiento se basa en el uso de la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) como método de extracción, seguido de una etapa de concentración y determinación mediante HPLC-DAD.

El método de extracción, desarrollado previamente para muestras de mejillón, tuvo que ser modificado con respecto a la cantidad de muestra para poder ser aplicado. En las condiciones finales, 0.2 g de muestra liofilizada se dispersaron sobre 2 g de C18 y se transfirieron a un cartucho con ENVI-Carb-II/SAX/PSA (500/500/500 mg). A continuación, la muestra dispersada se lavó con 10 mL de n-hexano, y los analitos se eluyeron con 20 mL de acetato de etilo y 5 mL de acetonitrilo. Finalmente, el extracto se concentró a sequedad, se redisolvió en 1 mL de metanol y se analizó mediante HPLC-DAD.

La validación del método fue llevada a cabo de acuerdo a los criterios establecidos en el documento SANCO/12571/2013 para métodos de validación y procesos de control de residuos de pesticidas en alimentos y piensos. La exactitud y precisión del método se evaluó a dos niveles de concentración, 0.5 mg/kg y 5 mg/kg. Las recuperaciones obtenidas son satisfactorias para todos los compuestos, con valores comprendidos entre 88-105 % y entre 96-100 % para el nivel más bajo y alto respectivamente. En cuanto a la repetibilidad y la reproducibilidad, los valores de desviación estándar relativa fueron inferiores al 13 % para ambos casos.

Por todo esto, se puede concluir que el método es adecuado para la determinación simultánea de las nueve triazinas en muestras de trucha. Cabe destacar que la extracción mediante MSPD presenta grandes ventajas frente a las técnicas convencionales, ya que es una técnica simple, rápida, de bajo coste, con un menor consumo de disolventes orgánicos y de requerimientos energéticos de acuerdo a los principios de la Química Verde.

A method has been validated for determination of nine triazine herbicides (ametryn, atrazine, cyanazine, prometryn, propazine, simazine, simetryn, terbuthylazine and terbutryn) in trout samples. The method is based on the use of Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) as extraction method, followed by a step of concentration and determination by HPLC-DAD.

The extraction method, previously developed for mussel samples, had to be modified with respect to the sample amount. Then, the dispersed sample was washed with 10 mL of n-hexane and analytes were eluted with 20 mL ethyl acetate and 5 mL acetonitrile. Finally, the extract was concentrated to dryness, reconstituted with 1 mL methanol and analyzed by HPLC-DAD.

The method validation was performed according to criteria established in the document SANCO/12571/2013 for method validation and control procedures for pesticide residues in food and feed. Accuracy and precision were evaluated at two concentration levels, 0.5 mg/kg and 5 mg/kg. The obtained recoveries are satisfactory for all compounds with values between 88-105 % and 96-100 % for the low and high levels respectively. As regards the repeatability and reproducibility, relative standard deviation values were lower than 13 % in both cases.

Therefore, it can be concluded that the method is suitable for simultaneous determination of nine triazine in trout samples. It is worthy to note that extraction by MSPD has great advantages when compared with conventional methods, since it is a easy of work, fast, low cost, with a lower consumption of organic solvents and energy requirements according to the principles of Green Chemistry.

7.

Bibliografía

Abhilash, P.C., Jamil, S. & Singh, N. (2007). Matrix solid phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. *Journal of Chromatography A*, 1176, 43-47.

Andreu, V. & Picó, Y. (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 10-11.

Barker, S.A. (2000). Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 63-68.

Barker, S.A. (2007). Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 151-162.

Beale, D.J.; Porter, N.A. & Roddick, F.A. (2009). A fast screening method for the presence of atrazine and other triazines in water using flow injection with chemiluminescent detection. *Talanta*, 78, 342-347.

Beceiro-Gonzalez, M.E., González-Castro, M.J., Pouso-Blanco, R., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P. & Prada-Rodríguez, D. (2012). Development of a Simple and Sensitive Method for Simultaneous Determination of Nine Triazines in Drinking Water in Compliance with European Union Directives. *Water, Air and Soil Pollution*. En prensa.

Brix, R.; Bahi, N.; López de Alda, M.J. ; Farré, M.; Fernández, J.M. & Barceló, D. (2009). Identification of disinfection by-products of selected triazines in drinking water by LC-Q-ToF-MS/MS and evaluation of their toxicity. *Journal Mass Spectrometry*, 44, 330-337.

Carafa, R., Wollgast, J., Canuti, E., Ligthart, J., Dueri, S., Hanke, G., et al. (2007). Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere*, 69, 10, 1625-1637.

Centre D'ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica (CESNID). *Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Taules de composició d'aliments per mesures casolances de consum habitual a Espanya*. McGraw-Hill interamericana, 2008. ISBN: 978-84-481-6090-6.

Commision Directive 2000/60/EC, Establishment and Framework for Community Action in the Field of Water Policy. *Official Journal European Community*. L 327, 1-73 (2000).

Commission Directive 2008/105/EC, Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy. *Official Journal European Community*. L 348, 84-97 (2008).

Commission Proposal for a Directive COM2011/876/EC, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the Field of Water Policy. COD 2011/0429, Brussels, 31 January 2012.

Council of European Commission. (1998) Directive on the quality of water intended for human consumption (98/83/EC). *Off. J. Eur. Commun.* L330.

Council of European Commission. (2001) Decision implementing Council Directive 2000/60/EC establishing the list of priority substances in the field of water (2455/2001/EC). *Off. J. Eur. Commun.* L331.

Council of the European Communities, Directive 2008/56/EC establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy. *Official Journal of European Union*, L 164,19-40 (2008).

Crescenzi, C., Bayoundh, S., Cormack, P.A.G., Klein, T. & Ensing, K. (2001). Determination of clenbuterol in bovine liver by combining matrix solid-phase dispersion and molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography/electrospray ion trap multiple-stage mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73, 2171-2177.

Dantas-Silva, M.G., Aquino, A., Silveira-Dórea, H. & Navickiene, S. (2008). Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. *Talanta*, 76, 680-684.

Damáso, J., Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D., Soares, A.M.V.M., et al. (2010). Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology*, 19, 1084-1094.

Directive 80/778/EEC of 15 Juli 1980 on the Quality of Water Intended for Human Consumption Twelve 229 / L 30-08-80.

Dopico-García, M.S. (2000). Determinación de Triazinas por Cromatografía de Líquidos en muestras acuosas. *Tesis de licenciatura do Departamento de Química Analítica*, Universidade de A Coruña.

Fang, G., Min, G., He, J., Zhang, C., Qian, K. & Wang, S. (2009). Multi walled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction adsorbents to determine 31 pesticides in agricultura samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 3040-3045.

FAO. 2002. *Actions Taken on the Recommendations of the Independent External Evaluation of the Special Programme for Food Security (SPFS)*. Hundred and Twenty-third Session, 28 Oct. -2 Nov. 2002; CL/123/INF/21. Rome.

Fernández, N., Fernández- Boán, M., Verísimo, P., & Freire, J. (2013). Assessing the spatial variability, level and source of organic chemical contaminants in bivalve fishing grounds on the Galician coast (NW Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 74, 291-301.

Ferrer, J.C., Gómez, M.J., García-Reyes, J.F., Ferrer I., Thurman, E.M. & Fernández-Alba, A.R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1069, 183–194.

Ferrer, I. & Thurman, E.M. (2007). Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1175, 24-37.

Food and Drug Administration, Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 4th ed (2011).

García-López, M., Canosa, P. & Rodríguez, I. (2008). Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 963-974.

Gaunt, P. & Barker, SA. (2000). Matrix solid phase dispersion extraction of triazines from catfish tissues; examination of the effects of temperature and dissolved oxygen on the toxicity of atrazine. *International Journal of Environment and Pollution*, 13, 284-312.

Homer M. LeBaron, Janis E. McFarland & Orvin C. Burnside. *The Triazine Herbicides. 50 Years Revolutionizing Agriculture*. Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-444-51167-6.

Kristenson, E.M., Ramos, L. & Brinkman U.A.Th. (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, 2, 96-111.

Kruve, A., Künnapas, A., Herodes, K. & Leito, I. (2008). Matrix effects in pesticide multiresidue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58-66.

Kubala-Drinic, H., Bazulic, D., Sapunar-Postruznik, D., Grubelic, M. & Stuhne, G. (2003). Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic determination of chloramphenicol in muscle tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 871-875.

Mendas, G.; Drevenkar, V. & Zupancic-Kralj, L. (2001). Solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene sorbent for high-performance liquid or gas chromatographic determination of urinary chloro- and methylthiotriazines. *Journal of Chromatography A*, 918, 351-359.

Method validation and control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. European Commission, Directorate of General Health and Consumer Protection. Document nº. SANCO/2013/12571, Brussels, 19 November 2013.

Navarro, M., Picó, Y., Marín, R. & Mañes, J. (2002). Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 968, 201-209.

Pacáková, V., Štulík, K. & Jiskra, J. (1996). High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. *Journal of Chromatography A*, 754, 17-31.

Pensado, L., Casais, M.C., Mejuto, M.C. & Cela, R. (2005). Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1077, 103-109.

Portugal, F.C.M.; Pinto, M.L. & Nogueira, J.M.F. (2008). Optimization of Polyurethane foams for enhanced stir bar sorptive extraction of Triazinic herbicides in water matrices. *Talanta*, 77, 765-773.

Ramos, J.J., González, M.J. & Ramos, L. (2009). Comparison of gas chromatography-based approaches after fast miniaturised sample preparation for the monitoring of selected pesticide classes in fruits. (2009). *Journal of Chromatography A*, 1216, 7307-7313.

Raoul Calvet, E. Barriuso, C. Bedos, P. Benoit, M.-P. Charnay & Y. Coquet. *Les pesticides dans le sol. Consequénces agronomiques et environnementales*. Éditions France Agricole, 2005. ISBN: 2-85557-119-7.

Rodríguez-González, N., González-Castro, M.J., Beceiro-Gonzalez, E., Muniategui-Lorenzo, S., & Prada-Rodríguez, D. (2014). Determination of Triazine Herbicides in Seaweeds: Development of a simple preparation method base on Matrix Solid Phase Dispersion and Solid Phase Extraction Clean-up. *Talanta*, 121, 194-198.

Rodríguez-González, N., González-Castro, M.J., Beceiro-Gonzalez, E. & Muniategui-Lorenzo, S. (2015). Development of a Matrix Solid Phase Dispersion methodology for the determination of triazine herbicides in mussels. *Food Chemistry*, 173, 391-396.

Rosenblum, L., Hieber, T. & Morgan, J. (2001). Determination of pesticides in composite dietary samples by gas chromatography/mass spectrometry in the selected ion monitoring mode by using a temperature-programmable large volume injector with pre-separation column. *Journal of AOAC International*, 84, 891-899.

Ruiz, M.J., Cameán, A.M., Moreno, I.M. & Picó, Y. (2005). Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1073, 257-262.

Stanford University. (2009, September 8). Half Of Fish Consumed Globally Is Now Raised On Farms, Study Finds. *ScienceDaily*.

Souza-Caldas, S., Bolzan, C.M., Jaime de Menezes, E., Venquiaruti-Escarrone, A.L., Gaspar-Martins, C. de M., Bianchini, A. & Gilberto-Prinel, E. (2013). A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. *Talanta*, 112, 63-68.

Tseng, S.H., Lin, Y.J., Chang, P.C., Chou, S.S. & Chang H.M. (2004). Determination of simazine residue in sugarcane by application of matrix solid phase dispersion (MDPD) technique. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12, 74-78.

Tsuda, T., Nakamura, T., Inoue, A. & Tanaka, K. (2009). Pesticides in water, fish and shellfish from littoral area of Lake Biwa. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 82, 716-721.


Wang, Y., You, J.Y., Ren, R.B., Xiao, Y., Gao, S.Q., Zhang, H.Q., et al. (2010). Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4241-4246.

Wen, Y.Y., Chen, L.X., Li, J.H., Ma, Y.L., Xu, S.F., Zhang, Z., et al. (2012). Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled to micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of triazines in soil, fruit, and vegetable samples. *Electrophoresis*, 33, 15, 2453-2463.

Outras fontes consultadas:

 <http://www.pescadegalicia.com/gl/pesca-fresca-e-marisqueo>

 <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>

 <http://www.pesticidechem.com>

