

## Suficiencia Investigadora



# DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS BENZIMIDAZOLICOS EN MUESTRAS LIQUIDAS MEDIOAMBIENTALES MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO SPME-HPLC

(SOLID-PHASE MICROEXTRACTION OF BENZIMIDAZOLE FUNGICIDES IN  
ENVIRONMENTAL LIQUID SAMPLES AND HPLC-FLUORESCENCE DETERMI-  
NATION)

**AROA LÓPEZ MONZÓN**

**2007**

**DETERMINACIÓN DE  
FUNGICIDAS  
BENZIMIDAZOLICOS EN  
MUESTRAS LIQUIDAS  
MEDIOAMBIENTALES  
MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO  
SPME-HPLC**

(SOLID-PHASE MICROEXTRACTION OF BENZIMIDAZOLE  
FUNGICIDES IN ENVIRONMENTAL LIQUID SAMPLES AND  
HPLC-FLUORESCENCE DETERMINATION)

**AROA LÓPEZ MONZÓN**

# **ÍNDICE**

- 1. INTRODUCCIÓN (3)**
- 2. OBJETIVOS (12)**
- 3. MÉTODOS CONVENCIONALES PARA LA EXTRACCIÓN DE FUNGICIDAS BENCIMIDAZÓLICOS (13)**
- 4. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) (15)**
- 5. ASPECTOS EXPERIMENTALES (17)**
  - 5.1. REACTIVOS (17)
  - 5.2. FIBRAS SPME (18)
  - 5.3. INSTRUMENTACIÓN Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA (19)
  - 5.4. PROCEDIMIENTO DE SPME (21)
  - 5.5. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (22)
  - 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO (23)

## **6. RESULTADOS Y DISCUSION (24)**

### 6.1.OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN (24)

6.1.1. Optimización del proceso de absorción

6.1.2. Optimización del proceso de desorción

### 6.2.PARÁMETROS ANALÍTICOS (33)

### 6.3.APLICACIÓN A MUESTRAS REALES (34)

## **7. CONCLUSIONES (44)**

## **8. REFERENCIAS (45)**

## **9. COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES A CONGRESOS (50)**

# 1. INTRODUCCIÓN

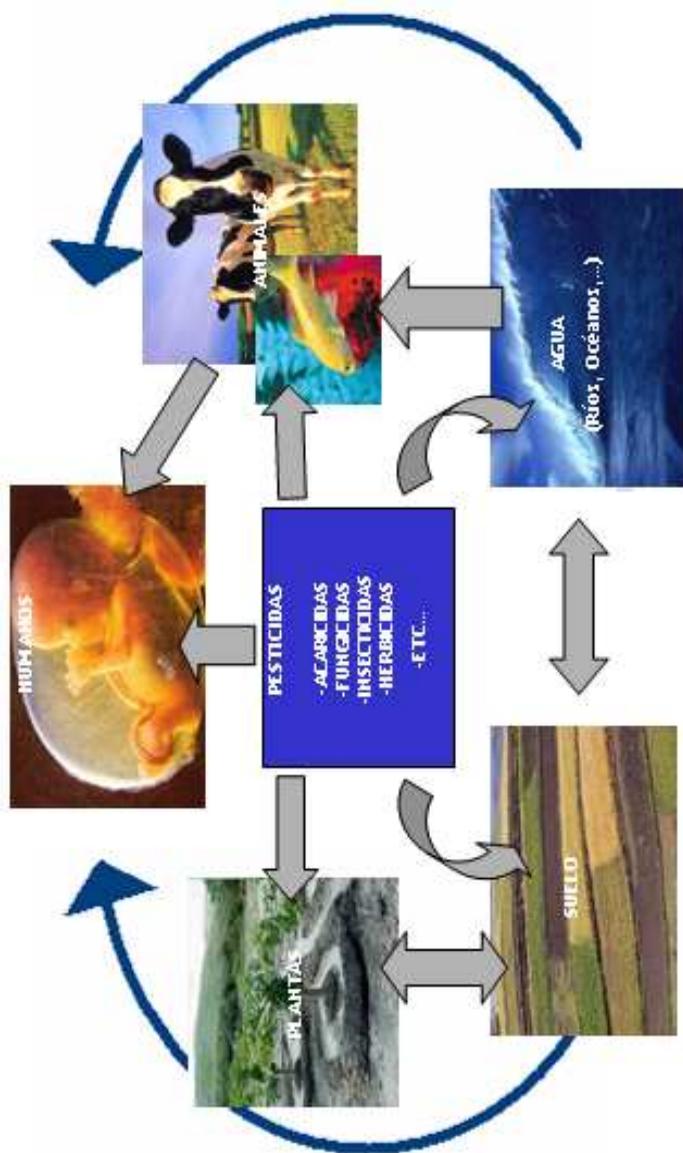
Los pesticidas son sustancias químicas destinadas a combatir plagas en el más amplio sentido. El uso de pesticidas se generalizó tras la segunda guerra mundial y su utilización está vinculada al cambio en los modelos de producción y cultivo que supusieron un importante aumento en la productividad agrícola. Hoy los pesticidas tienen acciones muy variadas: insecticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, acaricidas, y reguladores del crecimiento entre otros.

Estos compuestos han beneficiado e incrementado la producción agrícola y combaten enfermedades humanas y animales; no obstante, su uso de manera continuada y descontrolada hace que se produzcan efectos negativos sobre la salud humana, la supervivencia de multitud de especies y el medio ambiente en general.

La resistencia química a la degradación de los pesticidas favorece la contaminación de aguas, la incorporación a suelos, vegetales y animales que

al ser consumidos actúan como transportadores de los pesticidas facilitando su acumulación en organismos vivos. Los factores mencionados forman un ciclo cerrado que se retroalimenta y refuerza profundizando los efectos adversos (**Figura 1**). Del mismo modo, mediante los residuos y desechos producidos, los plaguicidas o sus metabolitos vuelven al agua, al suelo, a la flora y fauna provocando el reforzamiento del ciclo, la pérdida de biodiversidad y la degradación de todos los recursos.

Los pesticidas que nos ocupan pertenecen al grupo de los fungicidas, que son empleados en el control de ataques de hongos sobre los cultivos. Representan alrededor de un 20% del total de los pesticidas usados en la mayoría de los países, siendo su uso ampliamente extendido en comunidades agrícolas. En países como España y Estados Unidos este porcentaje se eleva hasta el 25%.



**Figura 1.-** Ciclo de los pesticidas

Los fungicidas bencimidazólicos son pesticidas sistémicos, es decir, que la sustancia se activa dentro de la planta y su uso está ampliamente extendido en agricultura para el tratamiento pre- y post-cosecha de un amplio rango de patógenos. Presentan características muy definidas en cuanto a su comportamiento frente a los hongos de tipo Ascomicetos (**Figura 2**) que es un grupo de hongos muy numeroso y heterogéneo.



**Figura 2.-** Planta afectada por una variedad de hongo *Ascomicetos*

Estas sustancias son aplicadas directamente al suelo o pulverizadas sobre el campo de cultivo, y de aquí pasan al medio ambiente. Estos compuestos penetran rápidamente en la planta a través de las raíces y las hojas, pudiendo directamente a flujos de aguas naturales o ser drenados a través del terreno. Algunos de ellos actúan como sustancias activas de diferentes formulaciones. La mayoría son realmente persistentes en el medio, pudiendo permanecer en él algunos años tras su aplicación.

Algunos de los principales pesticidas de la familia de los bencimidazoles son el benomilo (BN), la carbendazima (MBC), el tiabendazol (TBZ), y el fuberidazol (FB). Varios actúan como sustancias activas de diferentes formulaciones comerciales [1] de gran efectividad. A continuación se describen sus principales características, así como su estructura (**Figura 3**).

## **BENOMILO**

*[metil 1-butilcarbamoil-bencimidazol-2-ilcarbamato]*

Este compuesto actúa por contacto, y es aplicado sobre el suelo de cultivo para controlar un gran número de enfermedades en frutales. Es rápidamente degradado a carbendazima, siendo éste último su principal producto de degradación. Por este motivo las características que vamos a describir en el siguiente apartado para la carbendazima son aplicables también al benomilo.

## **CARBENDAZIMA**

*[metil bencimidazol-2-ilcarbamato]*

Es el ingrediente activo más extendido de los fungicidas del grupo de los carbamatos bencimidazólicos [2]. Este compuesto presenta una doble acción curativa y de protección frente a multitud de enfermedades por hongos. Es tóxico en humanos, animales y plantas, además de ser

sumamente persistente en aguas naturales, aguas residuales, suelo cultivos y alimentos.

## **FUBERIDAZOL**

*[2-2-furil-bencimidazol]*

Este es uno de los bencimidazoles menos estudiados, aunque su consumo como pesticida, es muy importante en numerosos países. A esta característica hay que añadir que es el más peligroso para el medio acuático, de los cuatro que abarca este estudio.

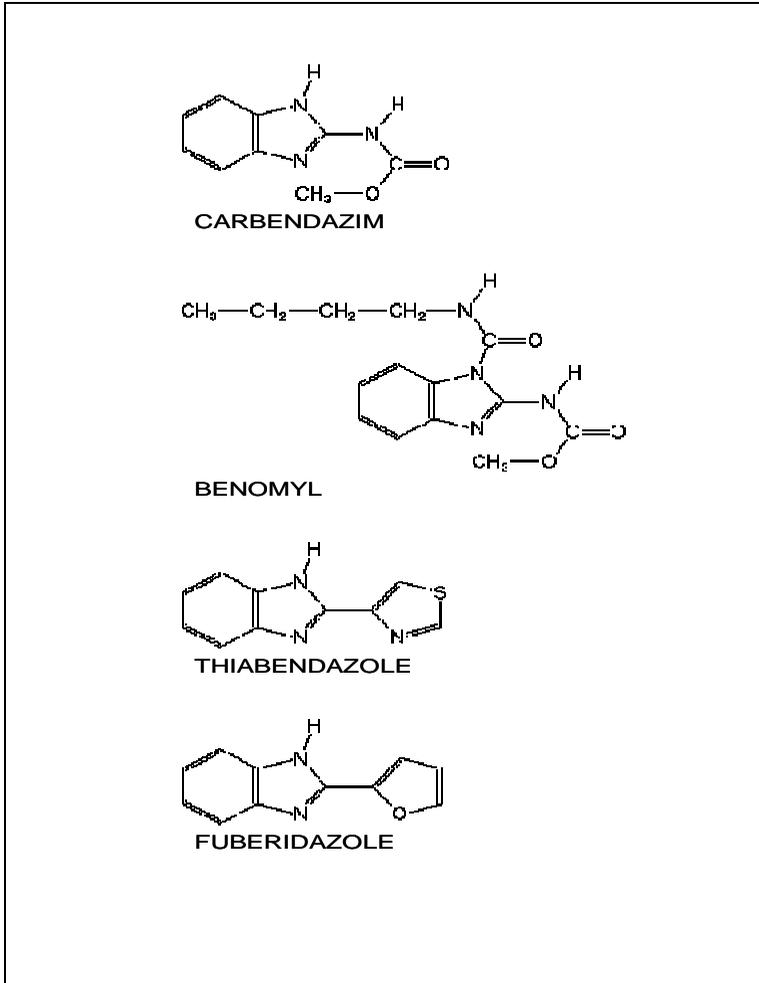
## **TIABENDAZOL**

*[2-tiazol-4-ilbencimidazol]*

Se emplea en el control de enfermedades como la roya, el moho o la putrefacción en frutales y vegetales; además evita la aparición de hongos en el proceso de almacenamiento de frutas, hortalizas y frutos secos. Su uso farmacológico como antihelmíntico está muy extendido tanto en el

tratamiento de seres humanos, como en el de ganaderías o animales domésticos.

No existen suficientes datos en cuanto a la presencia de estos compuestos en el medio marino aunque gracias a experiencias de laboratorio se evidencia que algunos de ellos son muy tóxicos para los organismos marinos, como peces o algas **[3-5]**.



**Figura 3.-** Estructura molecular de fungicidas bencimidazólicos.

## **2. OBJETIVOS**

El estudio que se plantea tiene como objetivo principal el establecer y desarrollar un nuevo método sensible y preciso para la determinación simultánea de fungicidas bencimidazólicos en muestras medioambientales acuosas, mediante el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la microextracción en fase sólida. Para ello se evaluará la eficiencia de la extracción de los compuestos en estudio, usando distintos tipos de fibras y optimizando las variables del procedimiento SPME como son el tiempo de extracción, la fuerza iónica, la temperatura de extracción y el tiempo de desorción. El método optimizado se aplicará posteriormente a la determinación de dichos compuestos en distintas matrices líquidas ambientales: agua de mar, agua depurada y agua subterránea.

### 3. MÉTODOS CONVENCIONALES PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS BENCIMIDAZÓLICOS

Los métodos usados con más frecuencia para determinar bencimidazoles son:

- Espectroscopia de fluorescencia **[6-8]**
- Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección por fluorescencia, absorción UV o espectrometría de masas **[9,10]**

En este punto hemos de destacar que el benomilo es un compuesto altamente inestable, por lo que en todas estas técnicas es casi inmediatamente convertido a carbendazima durante el proceso analítico siendo éste último el compuesto usado para su determinación.

En cuanto a los métodos de extracción y preconcentración en muestras líquidas, podemos citar:

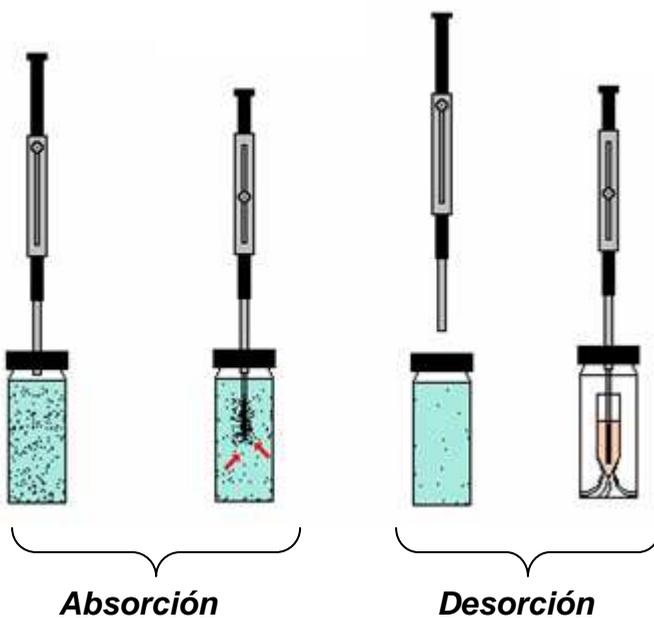
- Extracción en fase sólida (SPE) **[6,7]**
- Extracción líquido-líquido (LLE) **[10,11]**
- Extracción por “punto de nube” (CPE) **[12]**
- Extracción líquido-líquido con membrana microporosa **[13]**
- Extracción con fluidos supercríticos (SFE) **[14]**

## 4. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La microextracción en fase sólida (SPME) es una nueva variación de las técnicas de extracción que han sido aplicadas para el análisis de compuestos orgánicos en muestras ambientales [22-25]. Esta técnica permite realizar la extracción y preconcentración de los analitos presentes en una muestra de manera simultánea. En SPME distinguimos varias etapas (**Figura 4**): una primera etapa de separación de los analitos desde la muestra a la fibra de sílice fundida, y una segunda fase de desorción de los analitos en el vial con disolvente orgánico.

La microextracción en fase sólida tiene muchas aplicaciones en el análisis de pesticidas seguido de una determinación por GC o HPLC [26-32]. Debido a la inestabilidad térmica de los bencimidazoles, éstos no pueden ser analizados por cromatografía de gases, a menos que hayan sido transformados previamente a derivados térmicamente estables [14]; este uno de los

motivos por lo que frecuentemente se emplea HPLC con detección fluorescente para su determinación.



**Figura 4.-** Esquema del proceso en SPME

## 5. ASPECTOS EXPERIMENTALES

### 5.1. REACTIVOS

Los estándares de carbendazima (metil bencimidazol-2-ilcarbamato), benomilo (metil 1-butilcarbamoil-bencimidazol-2-ilcarbamato), tiabendazol (2-tiazol-4-ilbencimidazol) y fuberidazol (2-2-furil-bencimidazol) fueron obtenidos de Riedel de Haën (Seelze, Alemania) con una pureza mínima del 99%. Los compuestos estudiados aparecen listados en la **Tabla 1** y sus estructuras en la **Figura 3**.

**Tabla 1.-** lista de fungicidas bencimidazólicos, longitudes de onda de excitación/emisión y tiempos de retención

Abreviatura	Compuesto	$\lambda$ Excitación (nm)	$\lambda$ Emisión (nm)	T <sub>R</sub> (min)
MBC	<i>Carbendazima</i>	280	320	3.5
BN	<i>Benomilo</i>	280	320	3.5
TBZ	<i>Tiabendazol</i>	300	350	5.3
FB	<i>Fuberidazol</i>	300	350	5.9

Las soluciones de los fungicidas individuales fueron preparadas en metanol, a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y almacenadas en botellas de color ámbar a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . El agua Milli-Q ultrapura (Millipore, España) se utilizó en la preparación de las disoluciones estándar acuosas ( $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC y BN,  $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB). El metanol empleado para disolver los estándares, preparar la fase móvil y desorber los analitos fue de calidad (grado) HPLC de Scharlau (Barcelona, España). La fase móvil se filtró a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa con un tamaño de poro de  $0.22 \mu\text{m}$  y sometida a ultrasonidos antes de su utilización.

## **5.2. FIBRAS SPME**

Las fibras ensayadas en este trabajo, con el fin de escoger la que mejor se adaptara a las características de nuestros pesticidas fueron: Polidimetilsiloxano Divinilbenceno (PDMS-DVB)  $65\mu\text{m}$ , Carboxen Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS)  $75\mu\text{m}$  y Poliacrilato (PA)  $85\mu\text{m}$ ; todas ellas

suministradas por Supelco (Bellafonte, PA, EE.UU.). Fue necesario un acondicionamiento y estudio previo de la fibra para garantizar una buena selectividad y sensibilidad en los resultados. Las fibras fueron acondicionadas con metanol de acuerdo con las instrucciones dadas por el proveedor.

### **5.3. INSTRUMENTACIÓN Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA**

El sistema cromatográfico (**Figura 5**) consistió en una bomba de la marca Varian adaptada con un automuestreador Varian 410, con un selector de volumen, un módulo válvulas-columnas con horno interno, y un detector de fluorescencia Varian de longitud de onda variable. El sistema y el manejo de datos fueron controlados por el programa Star de Varian (Varian Inc., Madrid. España).



**Figura 5.-** Sistema cromatográfico (Varian) utilizado en el estudio

La columna de separación fue Simmetry C-18, 3.9×150mm, con un diámetro de partícula de 8µm. Durante los estudios, la columna se mantuvo a una temperatura de  $30\pm 0.2^{\circ}\text{C}$  en el correspondiente módulo.

La composición de la fase móvil fue optimizada para conseguir la mejor separación y determinación de los fungicidas bencimidazólicos, resultando como más idónea una proporción

metanol:agua 45:55 (v/v) y usando un régimen isocrático con un flujo de  $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . En estas condiciones el benomilo es totalmente convertido a carbendazima, realizándose su cuantificación como tal (véase pico MBC/BN).

En la **Tabla1** se muestran los tiempos de retención y las longitudes de onda de excitación-emisión empleadas en la determinación de estos pesticidas.

#### **5.4. PROCEDIMIENTO DE SPME**

Todas las extracciones se llevaron a cabo en disoluciones acuosas de MBC ( $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), BN ( $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), TBZ ( $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y FB ( $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en viales con tapa y septum de 4mL. La concentración de sal fue ajustada a un 15% (m/m) de NaCl. Las muestras fueron calentadas y agitadas a una velocidad constante de 600 r.p.m. durante el proceso de extracción. La fibra de SPME se sumergió en la muestra acuosa durante 40 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ . y la desorción de los compuestos se realizó en un vial de cristal de  $200 \mu\text{L}$  conteniendo

do 50 $\mu$ L de metanol y durante 10 minutos. Todas las medidas se llevaron a cabo por duplicado, siendo calculados los valores medios.

Después de cada análisis, la fibra se lavó con agua Milli-Q para evitar que su deterioro a causa de la cristalización de la sal. Tras este paso se sumergió la fibra en metanol durante 15 minutos y luego se secó antes de comenzar la siguiente extracción.

## **5.5. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**

Se usó una columna de extracción C<sub>18</sub> que se acondicionó previamente haciendo pasar por ella sucesivas eluciones de 6 ml de metanol y 6 ml de agua obtenida del sistema Milli-Q. Luego se pasó una alícuota de 50 ml de muestra de agua que contenía MBC (200 ng·mL<sup>-1</sup>), BN (200 ng·mL<sup>-1</sup>), TBZ (100 ng·mL<sup>-1</sup>) y FB (1 ng·mL<sup>-1</sup>), con el fin de que estos quedasen retenidos en la columna. Antes de la elución de los fungicidas, la columna se secó haciendo pasar aire a través de ella. Los fungicidas fueron finalmente eluidos con 5 ml de metanol y 20

$\mu\text{L}$  del extracto se inyectaron en el sistema cromatográfico.

## **5.6. ANALISIS ESTADÍSTICO**

El diseño experimental para la optimización de las condiciones de SPME se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics Plus, versión 5.1 (Manugistic, Rockville, MD, EE.UU.). Las correlaciones parciales y divariadas se obtuvieron con el programa SPSS 11.0 (Chicago, IL, EE.UU.).

## **6. RESULTADOS Y DISCUSION**

Para asegurar una alta eficiencia de la extracción de analitos de una muestra por SPME, se optimizaron aquellos parámetros que tienen mayor influencia en la extracción. Entre ellos se encuentran el tipo de fibra, la fuerza iónica, el tiempo de extracción, la temperatura y el tiempo de desorción.

### **6.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN**

Se realizó un estudio para escoger la fibra que extrajera mejor los fungicidas bencimidazólicos. La elección de esta fibra se hizo teniendo en cuenta la respuesta relativa a estos pesticidas. Se usaron tres tipos de fibra: Polidimetilsiloxano Divinilbenceno (PDMS-DVB) 65µm, Carboxen Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) 75µm y Poliacrilato (PA) 85µm. La extracción se realizó a temperatura ambiente durante 40 minutos. Las fibras fueron acondicionadas como se describe en

la sección experimental. La **Tabla 2** muestra las áreas relativas obtenidas para cada fibra. Los mejores resultados se obtuvieron con la fibra CAR-PDMS, siendo ésta la fibra seleccionada.

**Tabla 2.-** Comparativa de la respuesta relativa de los distintos tipos de fibras sumergidas en una muestra de fungicidas bencimidazólicos

FIBRA	AREA RELATIVA		
	MBC/BN	TBZ	FB
Carboxen-PDMS 75 $\mu\text{m}$	384305	1885692	3780452
PDMS-DVB 60 $\mu\text{m}$	66245	95256	232833
PA 85 $\mu\text{m}$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>

a) nd: no detectado

### **6.1.1. Optimización del proceso de absorción**

Para obtener las mejores condiciones de extracción se estudió el efecto de la temperatura de absorción, el tiempo de absorción y la adición de sal en el procedimiento de microextracción en fase sólida. Para estudiar estos tres factores se realizó un diseño factorial multivariable [33,34]. Inicialmente se estudiaron las variables con un

diseño factorial de orden  $2^3$  para obtener la influencia que tenía cada variable en la extracción y la correlación entre las mismas. Las correlaciones parciales y divariadas obtenidas a través del diseño que hemos adaptado se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.-** Variables relevantes y correlación de las variables <sup>a</sup>

Correlación	MBC/BN	TBZ	FB
Tiempo de Absorción	0.177	0.399	0.563
Temperatura	0.325	0.507	0.598
Concentración de NaCl	0.862	0.648	0.347
Timp.Abs. x Temp.	-0.062	-0.256	-0.495
Timp.Abs. x NaCl	-0.305	-0.375	-0.246
Temp. x NaCl	-0.583	-0.500	-0.276

<sup>a</sup> Las máximas correlaciones corresponden a los valores +1 y -1

La temperatura (°C) y la adición de sal (% m/v, NaCl) son las variables que más afectan a la recuperación, y a su vez, el tiempo de absorción (min.) está altamente correlacionado con la concentración de sal. Por este motivo estas variables se estudiaron en dos diseños factoriales  $3^2$ : tiempo de absorción con temperatura y tiempo

de absorción con porcentaje de sal. El experimento incluye nueve series por duplicado, pudiéndose incluir otras variables en el proceso de extracción manteniéndolas constantes, como es el caso de la agitación (600 r.p.m.) y el tiempo de desorción (10 min).

Para asegurar la eficiencia del proceso de extracción de los analitos de una muestra, uno de los pasos más importantes en el desarrollo de éste método es determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre la matriz de la muestra y la fibra. En este sentido, la temperatura de extracción juega un papel fundamental en el proceso de extracción, ya que ésta influye en las tasas de transferencia de masa y en los coeficientes de partición de los analitos.

Para la optimización de estas variables, se estudió la eficiencia de extracción (representada por las áreas relativas de los picos del cromatograma) de los analitos a distintos tiempos de extracción, en un intervalo de 20-60 minutos, y en un rango de temperatura de 20-60°C. En este

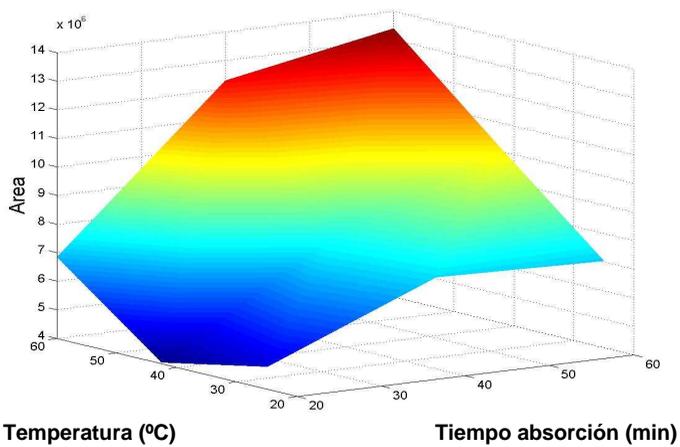
estudio se mantuvo la concentración de sal constante al 30% (m/v) de NaCl. La **Figura 6** muestra la superficie de respuesta relativa para las variables *tiempo de absorción* y *temperatura* para el caso del TBZ. Se observa en ella un gran incremento de la eficiencia de extracción con el aumento del tiempo de absorción hasta los 40 minutos, a partir del cual el aumento no es significativo, produciéndose una estabilización progresiva de las áreas relativas, a pesar de obtener valores ligeramente superiores para un tiempo de absorción de 60 minutos. Por este motivo se eligió un tiempo de 40 minutos como tiempo óptimo.

Por otra parte, la eficiencia de la extracción se incrementa con la temperatura, obteniendo las áreas máximas a 60 °C. Los resultados obtenidos para el resto de los fungicidas estudiados son similares a los encontrados para el TBZ.

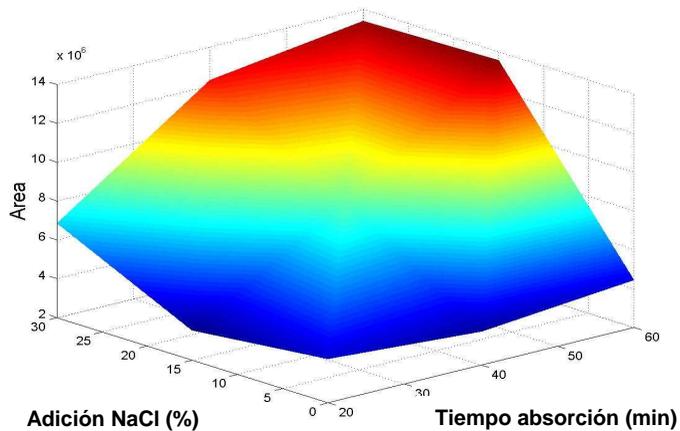
De acuerdo los resultados anteriores, se escogió un tiempo de absorción de 40 minutos y una temperatura de extracción de 60 °C con un

compromiso razonable entre una alta sensibilidad y un tiempo de análisis aceptable para los fungicidas bencimidazólicos

El efecto de la fuerza iónica es de gran importancia en SPME. Esto se comprobó usando distintos tiempos de extracción (20-60 min.) con concentraciones de NaCl que oscilaban entre 0-30% (m/v), calculando las áreas relativas obtenidas. Los resultados indican que los incrementos de las áreas de los picos en presencia de NaCl son máximas en la franja del 15-30 % (m/v) de sal. Finalmente seleccionamos una concentración del 15 % (m/v), en un tiempo de absorción de 40 minutos. Un valor superior en la concentración de sal, además de no producir un incremento significativo en el área de pico, podría estropear con mayor celeridad nuestra fibra. La **Figura 7** muestra la superficie de respuesta relativa para el efecto del tiempo de absorción y la concentración de NaCl para el TBZ. Resultados similares se obtuvieron para el resto de los bencimidazoles estudiados.



**Figura 6.-** Superficie de respuesta temperatura / tiempo de absorción para TBZ

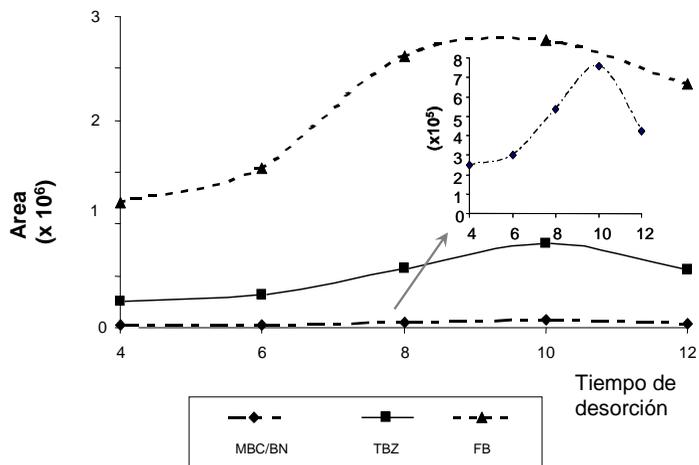


**Figura 7.-** Superficie de respuesta concentración de NaCl / tiempo de absorción para TBZ

### 6.1.2. Optimización del proceso de desorción

En el proceso de desorción es importante hacer un análisis del tiempo necesario para que se lleve a cabo dicho proceso. Para este estudio se seleccionó el metanol como disolvente para la desorción. Tras el proceso de absorción de una disolución de analitos en condiciones óptimas (40 min., 60 °C y 15% (m/v) de NaCl), optimizamos la desorción sumergiendo la fibra CAR-PDMS en 50 µL de metanol en un vial de cristal durante tiempos que oscilaron entre los 4 y los 12 minutos. Si la tasa de desorción de los analitos es baja, un incremento en el periodo de desorción podría elevar la eficiencia de extracción de los mismos. La **Figura 8** muestra los resultados obtenidos para los distintos benzimidazoles en el intervalo de tiempo estudiado para la optimización de la desorción. Se advierte que las áreas de los picos de los analitos aumentan a medida que lo hace el tiempo de desorción hasta los 10 minutos, tiempo después del cual las áreas comienzan a disminuir. Por tanto, seleccionamos

como óptimo un periodo de desorción de 10 minutos.



**Figura 8.-** Optimización de los tiempo de desorción para MBC/BN (◆), TBZ (■) y FB (▲).

En resumen, los parámetros óptimos de extracción que se escogieron finalmente para los fungicidas bencimidazólicos fueron: 40 minutos de tiempo de absorción, 60 °C de temperatura de absorción, 15 % (m/v) de NaCl y 10 minutos de tiempo de desorción en metanol.

## 6.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS

La linealidad del método ha sido investigada para rangos de 2-300 ng·mL<sup>-1</sup> de MBC, 2-300 ng·mL<sup>-1</sup> de BN, 0.5-300 ng·mL<sup>-1</sup> de TBZ y 0.05-5 ng·mL<sup>-1</sup> de FB. Cada punto de la curva de calibrado corresponde a la media de los valores obtenidos de dos medidas de áreas de pico y todos los coeficientes de correlación fueron superiores a 0.9920. La reproducibilidad, expresada como la desviación estándar relativa (RSD), se obtuvo del análisis de un grupo de seis réplicas de muestras con 200 ng·mL<sup>-1</sup> de MBC, 200 ng·mL<sup>-1</sup> de BN, 100 ng·mL<sup>-1</sup> de TBZ y 1 ng·mL<sup>-1</sup> de FB. Los valores de RSD obtenidos se encuentran en un intervalo entre el 7.9 y el 9 %. Los límites de detección se calcularon a partir de la señal de ruido de los picos individuales, asumiendo una relación señal/ruido igual a 3, como el mínimo detectable [35]. Los valores de este parámetro para los distintos fungicidas fueron 1.3 ng·mL<sup>-1</sup> para el MBC/BN, 0.04 ng·mL<sup>-1</sup> para el TBZ y 0.03 ng·mL<sup>-1</sup> para el FB.

Los coeficientes de correlación lineal ( $R^2$ ), reproducibilidad (RSD) y los límites de detección (LODs) obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.-** Parámetros analíticos para la determinación de fungicidas bencimidazólicos con SPME-HPLC

Compuesto	$R^2$ <sup>a</sup>	LOD (ng·ml <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD (%) <sup>c</sup>
MBC/BN	0.9920	1.30	9.0
TBZ	0.9996	0.04	6.6
FB	0.9942	0.03	7.9

<sup>a</sup> Rango de calibrado descrito en el texto

<sup>b</sup> límites de detección calculados como la señal de ruido de los tres tiempos de retención

<sup>c</sup> n=6

### 6.3. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

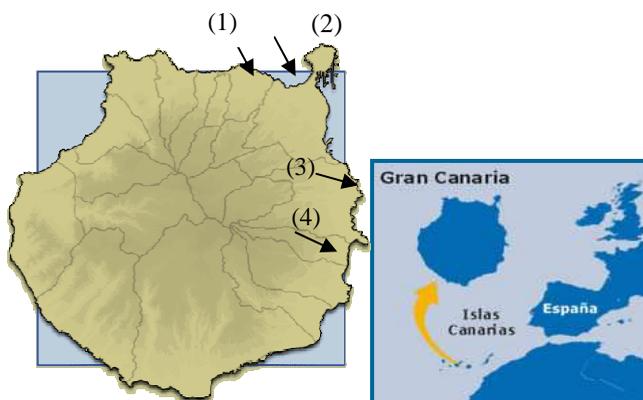
La combinación SPME-HPLC con detector de fluorescencia optimizada se aplicó a la determinación de los fungicidas bencimidazólicos en seis muestras líquidas enriquecidas con características distintas para demostrar la aplicabilidad y las posibilidades del método

desarrollado en él análisis de estos compuestos. Se analizaron cuatro muestras de agua de mar tomadas en distintos puntos de la costa de la isla de Gran Canaria (**Figura 9**): San Felipe<sup>(1)</sup> y Las Canteras<sup>(2)</sup>, localizadas al Norte de la isla, Taliarte<sup>(3)</sup> y Castillo del Romeral<sup>(4)</sup>, situadas al Este; una muestra de agua subterránea y una muestra de agua residual de una planta depuradora .

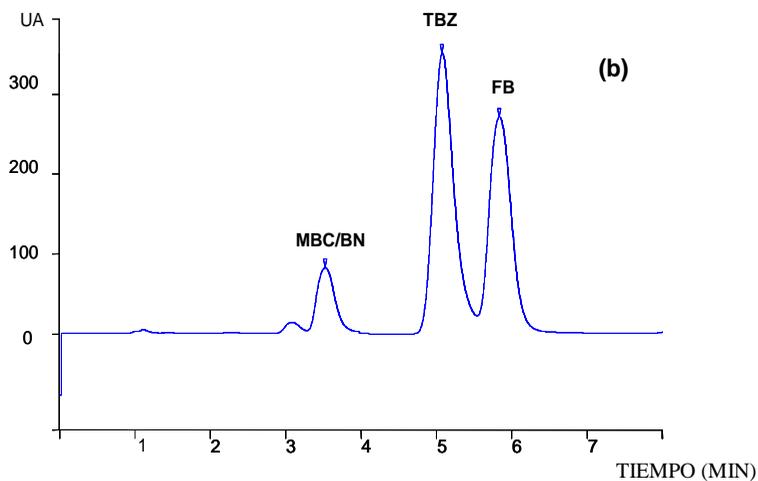
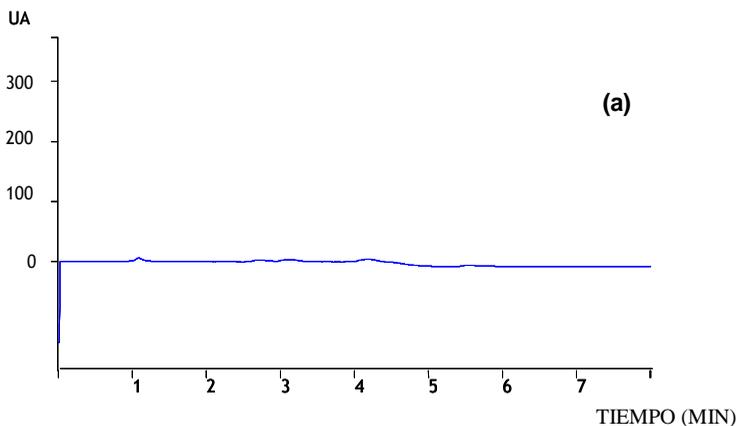
Las muestras se recogieron en botellas de cristal de 1L, filtradas a través de un filtro de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  y almacenadas en la oscuridad hasta el momento del análisis.

Previamente al análisis se realizó un blanco de la muestra real para verificar la ausencia de picos en los tiempos de retención que ocupan nuestros pesticidas. Se comprobó que efectivamente no aparecían picos que interfirieran en los cromatogramas de las muestras enriquecidas. Posteriormente, a las muestras reales se añadieron concentraciones de 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC, 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN, 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y 1  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB para comprobar la influencia de la

naturaleza de la matriz en el método. En la **Figura 10** se puede observar el cromatograma de una muestra no enriquecida de San Felipe (a) y el cromatograma de la misma muestra una vez la hemos enriquecido con nuestros fungicidas (b).



**Figura 9.-** Localización de las muestras de agua de mar. San Felipe<sup>(1)</sup>, Las Canteras<sup>(2)</sup>, Taliarte<sup>(3)</sup> y Castillo del Romeral<sup>(4)</sup>.



**Figura 10.-** Cromatograma de un blanco de una muestra de agua de mar (San Felipe, GC) (a), y un extracto de la misma muestra enriquecida (b)  $200\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC,  $200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN,  $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB en condiciones optimas.

La **Tabla 5** resume los porcentajes de recuperación obtenidos en la extracción de los compuestos en las muestras de agua enriquecidas, a las que se les aplicó el método optimizado.

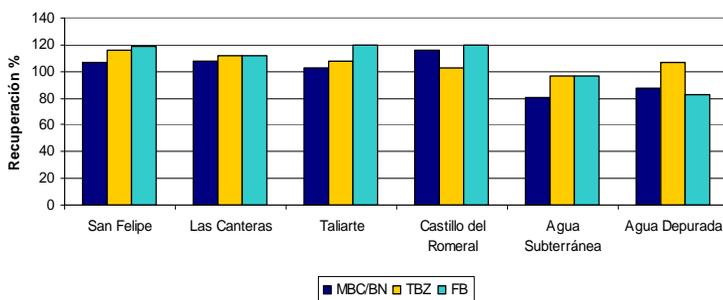
**Tabla 5.-** Recuperaciones (%) y RSDs obtenidos para diferentes muestras líquidas enriquecidas usando SPME-HPLC\*

Compuesto	San Felipe (1)	Las Canteras (2)	Taliarte (3)	Castillo del Romeral (4)	Agua Subter. (5)	Agua depurada (6)
MBC/BN	106.9±2.9	107.5±0.1	102.4±3.1	115.5±0.6	80.9±6.0	88.0±5.8
TBZ	115.7±1.5	111.9±3.3	108.1±1.1	103.0±0.2	96.9±2.9	106.7±0.9
FB	118.9±5.4	112.2±1.9	119.6±1.0	119.5±6.3	96.8±1.4	82.8±2.8

\* media de dos determinaciones

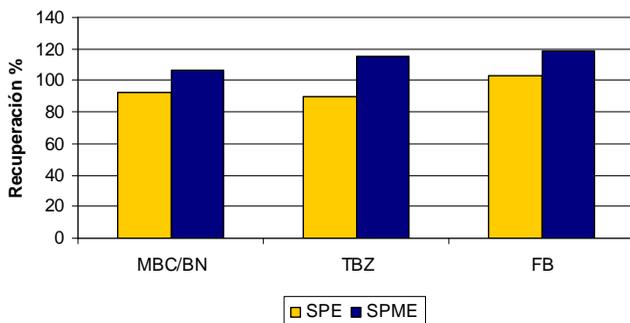
Los mismos resultados se pueden observar en la **Figura 11** en forma de diagrama de barras. Estos porcentajes se determinaron como la relación entre la cantidad extraída, calculada a partir de la curva de calibrado, y la cantidad inicial añadida a la muestra real. Cada valor corresponde a la media de los valores obtenidos a partir de dos medidas.

Los resultados obtenidos para las muestras de agua de mar son ligeramente mayores (aunque muy satisfactorios) de los esperados inicialmente. Esto puede ser debido a la presencia de distintos tipos de sales, a parte del NaCl, que no fueron incluidas a lo largo del desarrollo de nuestro estudio, pudiendo haber influido en el proceso de absorción. Para el caso de las muestras de agua subterránea y agua depurada los valores de recuperación que se obtienen también son muy satisfactorios. Esto nos muestra que la determinación de estos fungicidas con SPME acoplado a HPLC con detección fluorescente es segura y viable.

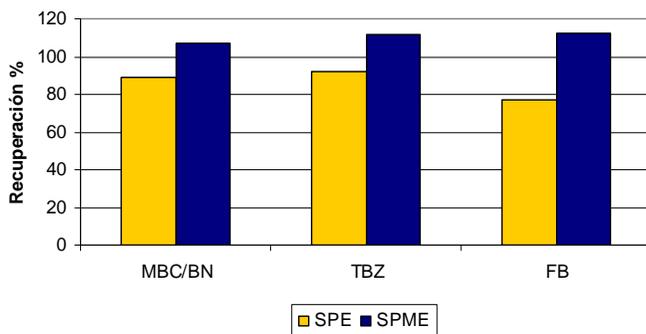


**Figura 11.-** Porcentajes de recuperación de las muestras de agua enriquecidas con  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC,  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN,  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB

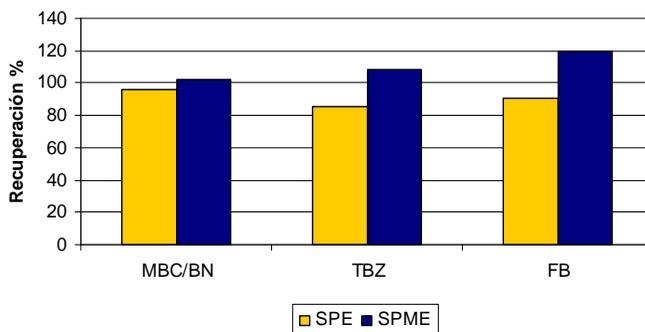
Finalmente y con objeto de comprobar la validez de los resultados obtenidos con el método optimizado, éstos fueron comparados con los obtenidos aplicando el procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) a las mismas muestras reales, usando un cartucho C<sub>18</sub>, en las condiciones especificadas en la Parte Experimental. En las **Figuras 12-16** aparecen ilustrados los resultados obtenidos para las distintas muestras de agua analizadas, observando que los resultados obtenidos con ambos procedimientos son comparables. Sólo en algunos casos las recuperaciones son ligeramente más bajas usando SPE.



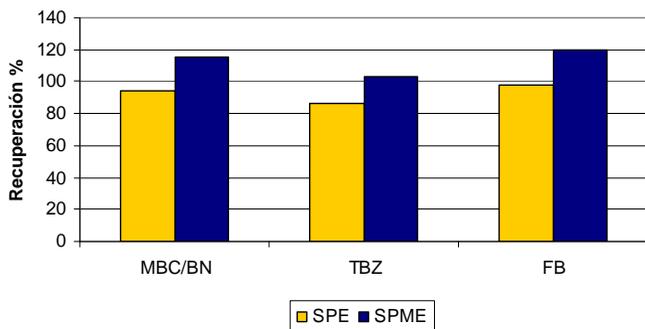
**Figura 12.-** Comparación de los resultados obtenidos para la aplicación de SPE y SPME para muestras de agua de mar de San Felipe enriquecidas con  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC,  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN,  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB.



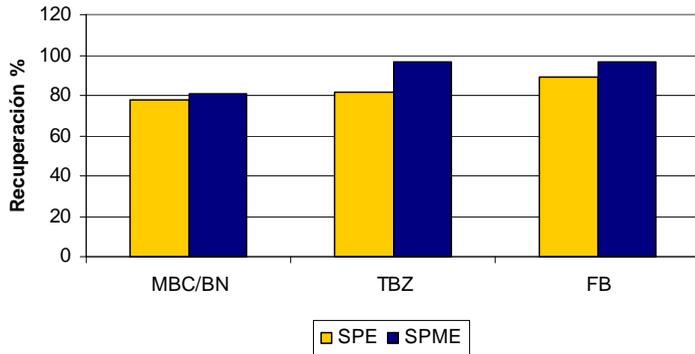
**Figura 13.-** Comparación de los resultados obtenidos para la aplicación de SPE y SPME para muestras de agua de mar de Las Canteras enriquecidas con  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC,  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN,  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB.



**Figura 14.-** Comparación de los resultados obtenidos para la aplicación de SPE y SPME para muestras de agua de mar de Taliarte enriquecidas con  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC,  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN,  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB.



**Figura 15.-** Comparación de los resultados obtenidos para la aplicación de SPE y SPME para muestras de agua de mar de Castillo del Romeral enriquecidas con  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC,  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN,  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB.



**Figura 16.-** Comparación de los resultados obtenidos para la aplicación de SPE y SPME para muestras de agua subterránea enriquecidas con  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MBC,  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BN,  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TBZ y  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FB.

## 7. CONCLUSIONES

Queda demostrado el potencial del acoplamiento SPME-HPLC con detección fluorescente para el análisis de fungicidas bencimidazólicos en muestras líquidas ambientales. La fibra CAR-PDMS tiene el recubrimiento óptimo para la extracción de estos compuestos. El método optimizado presenta una buena reproducibilidad y límites de detección bastante bajos para todos los fungicidas. Por otra parte, es simple, rápido, preciso y sensible para la determinación simultánea de MBC/BN, TBZ Y FB en distintas muestras de agua.

Éste método se podría emplear en el monitoreo y detección rápida de fungicidas bencimidazólicos en muestras líquidas ambientales contaminadas como una buena alternativa a los procedimientos tradicionales de extracción y preconcentración.

## 8. REFERENCIAS

1. De Liñan, C. (2004) "Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales" Ediciones Agrotécnicas S.L. (20ª Edición).
2. Guan X., Davis M.R., Jin L. and Baillie T.A. (1994). J. of Agricultural and Food Chemistry 42:2953-2957.
3. Environmental Health Criteria 148, Benomyl (1993) World Health Organization
4. Chemical Profile 2/85, Thiabendazole (1985) Arbotect Mertect
5. Tomlin, C. (1997). The pesticide Manual, 11th Edition. British Crop Protection Council, pp 632-633.
6. Picón Zamora D., Martínez Galera M., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L. (2000) Analyst 125:1167-1174
7. Garrido Frenich A., Picón Zamora D., Martínez Vidal J.L., Martínez Galera M. (2003) Anal. Chim. Acta 477:211-222

8. Martínez Galera M., Picón Zamora D., Martínez Vidal J.L., Garrido Frenich A., Espinosa-Mansilla A., Muñoz de la Peña A., Salinas López F. (2003) *Talanta* 59:1107-1116
9. Mazellier P., Leroy É., De Laat J., Legube B. (2003) *Environ Chem Lett* 1:68-72
10. Di Muccio A., Carmoni I., Ventriglia M., Attard Barbini D., Mauro M., Pelosi P., Generali T., Ausili A., Girolimetti S. (1995) *J. of Chromatogr A* 833:61-65
11. Tharsis N., Portillo J.L., Broto-Puig F., Comellas L. (1997), *J. of Chromatogr. A* 78: 95-101
12. Halko R., Padrón Sanz C., Sosa Ferrera Z., Santana Rodríguez J.J. (2004) *Chromatographia* 60:151-156
13. Sandahl M., Mathiasson L., Jönsson J.A. (2000) *J. of Chromatogr A* 893:123-131
14. Anastassiades M., Schwack W. (1998) *J. of Chromatogr A* 825:45-54

15. Del Nozal M.J., Bernal J.L., Jiménez J.J., Martín M.T.,  
Bernal J. (2005), *J. of Chromatogr A* 1076:90-96
16. Dowling G., Cantwell H., O'Keeffe M, Smyth M.R. (2005)  
*Anal. Chim. Acta* 529:285-292
17. Bernall J.L., Del Nozal M.J., Toribio L., Jiménez J.J.,  
Atienza J. (1997) *J. of Chromatogr A* 787:129-136
18. De Ruyck H., Daeseleire E., De Ridder H., Van  
Renterghem R. (2002) *J. of Chromatogr A* 976:181-194
19. Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., Mañes, J. (2001) *J. of  
Chromatogr. A* 924:387-396
20. Brito N.M., Navickniene S., Polese L., Jardim E.F.G.,  
Abakerli R.B., Ribeiro M.L. (2002), *J. of Chromatogr A*  
957:201-209
21. Veneziano A., Vacca G., Arana S., De Simona F., Rastrelli  
L. (2004) *J. Agric. Food Chem* 87:383-386

22. Dugay J., Miège C., Hennion M.C. (1998) *J. of Chromatogr A* 795:27-42
23. Namera A., So A., Pawliszyn J. (2002) *J. of Chromatogr A* 963:295-302
24. Martos P.A., Pawliszyn J. (1998) *Anal. Chem.* 70:2311-2320
25. Peñalver A., Pocurrull E., Borrull F., Marcé R.M. (2002) *J. of Chromatogr A* 953:79-87
26. Wu Y., Huang S. (1999) *Anal Chem* 71:310-318
27. Beltran J., López F.J., Hernández F. (2000) *J. of Chromatogr A* 885:389-404
28. San Pedro M.C., Martín O., López de Armentía C., Goicolea M.A., Rodríguez E., Gómez de Balugera Z., Costa Moreira J., Barrio R.J. (2000) *J. of Chromatogr A* 893:347-358

29. Navalón A., Prieto A. , Araujo L., Vílchez J.L. (2002) J. of Chromatogr A 975:355-360
30. Millán S., Sampedro M.C., Unceta N., Goicolea M.A., Rodríguez E., Barrio R.J. (2003) J. of Chromatogr A 995:135-142
31. Lambropoulou D.A., Albanis T.A. (2004) Anal Chim Acta 514:125-130
32. Sánchez-Ortega A., Sampedro M.C., Unceta N., Goicolea M.A., Barrio R.J. (2005) J. of Chromatogr A 1094:70-76
33. Pino V., Ayala J.H., Afonso A.M., González V. (2000) J. of Chromatogr A 869:515-522
34. Pino V., Ayala J.H., Afonso A.M., González V. (2001) Intern. J. Environ. Anal. Chem. 81:281-294
35. Taverniers I., Loose M.D., Van Bocstaele E. (2004) Trends in Anal. Chem. 23:535-552.

## 9. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

Este trabajo ha dado lugar a dos publicaciones con índice de impacto y a una comunicación en congreso internacional.

### **Publicaciones:**

- “Solid-phase microextraction of benzimidazole fungicides in environmental liquid samples and HPLC-fluorescence determination”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007) 387:1957-1963.
- “Determination of benzimidazole fungicides by coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection”. *Luminescence* (2006) 21:320-386.

## **Comunicaciones:**

**Título:** Determination of benzimidazole fungicides by coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.

**Congreso:** XIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry-Detection Techniques in Biomedical, Environmental and Food Analysis (ISLS).

**Lugar:** Lugo (España). Julio 2006.