



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**ESTABILIDAD DE CLOROFACINONA, BROMADIOLONA, DIFENACOUM Y
BRODIFACOUM EN MUESTRAS DE SUELOS AGRÍCOLAS**

Autor: Marta Alonso Hernández

Tutor/es: M^a Teresa Martín Gómez

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
4. OBJETIVO.....	6
5. EXPERIMENTAL.....	6
5.1. Instrumentación y reactivos.....	6
5.1.1. Reactivos	6
5.1.2. Disoluciones	6
5.1.3. Material de laboratorio.....	6
5.1.4. Equipo cromatográfico.....	7
5.2. Condiciones cromatográficas	9
5.3. Preparación de la muestra	15
5.4. Tratamiento de muestra.....	16
5.5. Calibrado en metanol	17
5.6. Calibrado en matriz	20
6. RESULTADOS.....	25
7. CONCLUSIONES.....	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31
9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	33

1. RESUMEN

En este trabajo se describe el método analítico para estudiar la estabilidad de cuatro rodenticidas anticoagulantes (*clorofacinona*, *bromadiolona*, *brodifacoum* y *difenacoum*) en suelos agrícolas por cromatografía de líquidos (HPLC) empleando diferentes detectores: detector de fluorescencia (FLD), UV-Vis (DAD) y espectroscopía de masas con ionización por electrospray (ESI-MS).

Para realizar este estudio, se adicionan a 16 muestras de suelo tamizado y seco, 3ml de solución patrón de los cuatro rodenticidas de concentraciones 100.0, 10.0, 5.0 y 0.5mg/L. Cuatro muestras de cada concentración se conservan a diferentes condiciones de temperatura: en frigorífico (4°C), en condiciones ambientales, a 20°C y a 30°C, para estudiar la estabilidad de cada analito.

A intervalos establecidos de tiempo, se trata 1g de cada muestra para su análisis. Dicho tratamiento consiste en añadir 15ml de metanol sobre el gramo de muestra. La solución se agita y centrifuga, se decanta para separar el suelo y se concentra hasta sequedad. El residuo se reconstituye en 1ml de metanol y se inyecta en un sistema HPLC. Las ocho muestras más diluidas se analizan por HPLC-MS acoplado a un ionizador electrospray (ESI) en modo negativo; y las ocho más concentradas se analizan por HPLC-FLD-DAD. La separación se realiza en régimen isocrático con una columna Gemini 5µm C₁₈, a 30°C, y empleando como fase móvil, una mezcla de formiato amónico 30mM (pH=6.5) y metanol (27/73; v/v) ⁽¹⁾.

2. INTRODUCCIÓN

Hasta hace unas décadas, en la Península Ibérica el topillo campesino (*Microtus Arvalis*) sólo se encontraba en lugares montañosos de la zona norte. Sin embargo, en los últimos años se ha ido extendiendo de manera incontrolada por Castilla y León. Está presente durante todo el año en diferentes cultivos, aunque a unas densidades bajas de población; sin embargo, cada cierto tiempo, la especie sufre fuertes explosiones demográficas.

La última plaga de topillo campesino en Castilla y León, catalogada como tal, comenzó a desarrollarse a principios de verano de 2006. Adquirió relevancia a partir del verano de 2007, cuando los campos de la meseta se vieron repletos de estos roedores que arrasaban los cultivos. En otros años su población no llegaba a alcanzar los 100 millones, pero en el verano de 2007, se estima que alcanzaron por lo menos los 700. Arrasaron un total de 500.000 hectáreas de cultivos y provocaron pérdidas por valor de 15 millones de euros ⁽²⁾. Todavía hoy, en 2014, se habla de “focos” en las provincias de Palencia, Segovia, Valladolid o Ávila.

Dentro de las medidas de control de plagas, el empleo de rodenticidas es una que podría considerarse como última, debido a que puede dar lugar a una gran cantidad de efectos no deseados, como daños ambientales a la fauna. Entre las múltiples especies afectadas, hay que destacar el milano real, especie en extinción en España. Además, una deficiente gestión podría facilitar la propagación de una enfermedad emergente en humanos, la tularemia, cuyas epidemias están asociadas a las plagas de topillo campesino.

Otro problema colateral del uso de rodenticidas es la persistencia de dichos compuestos en el campo, en concreto en los suelos agrícolas, ya que los productos químicos usados en agricultura entran en la cadena alimentaria a través de su aplicación al suelo o a los cultivos, y la penetración de sustancias en el suelo y su permanencia pueden afectar a las plantas, vida animal, medio ambiente y a la biodiversidad en general ⁽³⁾.

Estos hechos están conduciendo a la UE a una progresiva reducción de los tóxicos de esta familia autorizados para su uso en protección de cultivos, así como a nuevas

normas de uso en el seno de la Unión, de forma que actualmente es obligatorio instalar el veneno dentro de las toperas, nunca en superficie. De hecho, en Alemania y otros países centroeuropeos ya no está autorizado el uso de rodenticidas anticoagulantes en cultivos, habiendo sido sustituidos por fosfuro de zinc.

Ante esta situación, resulta interesante conocer la estabilidad de cualquier producto empleado para el control de plagas, puesto que en muchas ocasiones, las condiciones para su biodegradación no están presentes o el rodenticida resulta resistente a la degradación.

Por este motivo, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la estabilidad de los rodenticidas *Clorofacinona*, *Bromadiolona*, *Difenacoum* y *Brodifacoum* en muestras de suelo agrícola y la determinación de los posibles productos de degradación mediante HPLC-DAD-FLD-MS.

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los rodenticidas son compuestos ampliamente usados para controlar especies de roedores que pueblan el cultivo, molestando a los humanos y dañando diferentes tipos de bienes.

En este trabajo, se estudian los siguientes rodenticidas: *Clorofacinona*, *Bromadiolona*, *Brodifacoum* y *Difenacoum*, cuyas estructuras se muestran en la *Figura 1* ⁽⁴⁾.

- **Clorofacinona (CF)**: es un rodenticida derivado de la indanodiona. Presenta varios máximos de absorción en el ultravioleta cercano. No presenta fluorescencia.
- **Bromadiolona (BD), Difenacoum (DF) y Brodifacoum (BF)**: son rodenticidas derivados de la 4-hidroxicoumarina. Presentan absorción en el ultravioleta cercano y también fluorescencia.

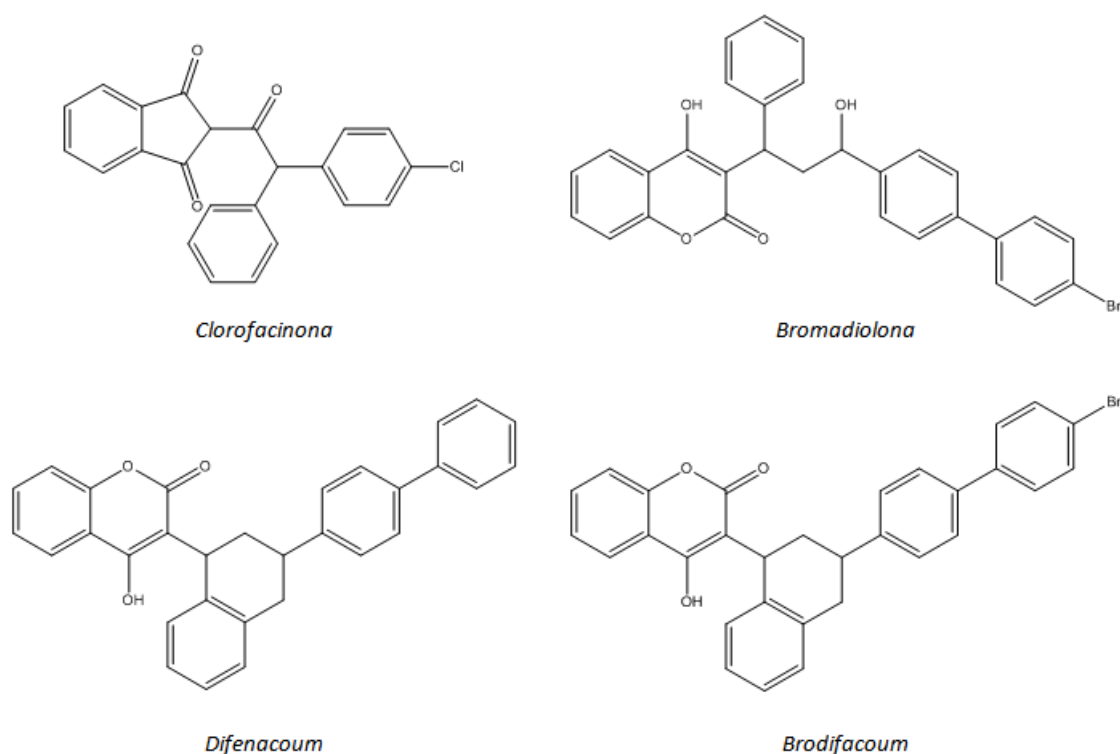


Figura 1. Estructura química de los rodenticidas estudiados

Estos compuestos son sustancias anticoagulantes que inhiben la síntesis de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K y las proteínas anticoagulantes c y s. En el tracto gastrointestinal son bien absorbidos y se acumulan principalmente en el hígado. Su antídoto es la vitamina K, que es necesaria para la síntesis de los factores

de coagulación II, VII, IX y X, en forma biológicamente activa, factores que inhiben los rodenticidas.

Los métodos más empleados en la determinación de rodenticidas anticoagulantes se basan en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detector de fluorescencia ⁽⁵⁾, de UV ^{(6) (7) (8)}, o espectrometría de masas ^{(4) (6) (9) (10)}. Las matrices analizadas son muy diversas, siendo dos de estos artículos ^{(8) (10)} los que desarrollan un método de análisis para determinar algunos rodenticidas en muestras de suelo. El artículo ⁽¹⁰⁾ es más reciente y en él se propone un método de análisis para determinar nueve rodenticidas, entre los que se encuentran los que se estudian en este trabajo: *clorofacinona*, *bromadiolona*, *difenacoum* y *brodifacoum*, empleando un detector espectrométrico de masas.

La mayoría de los artículos encontrados sobre la determinación de rodenticidas por HPLC corresponden a análisis en otras matrices, como tejidos animales, sangre ^{(4) (7)}, agua ⁽¹⁰⁾ o suero ⁽⁵⁾.

Otras técnicas emplean cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS), cromatografía en capa fina (TLC) ⁽¹¹⁾ o cromatográfica iónica con detector de fluorescencia ⁽¹²⁾.

En cuanto a los productos de degradación, hay pocos estudios sobre la estabilidad de los rodenticidas que aquí se estudian en diferentes matrices, pero sí que hay información sobre la estabilidad de estos compuestos químicos puros. La *clorofacinona* tiene una vida media al aire de menos de 60 días, y se degrada aun más rápido si se expone a luz solar directa; en cebos con parafina, tarda más de 60 días en degradarse a la mitad. Entre los productos de degradación de la *clorofacinona* se encuentra el ácido *p*-clorofenil acético y el ácido *o*-ftálico. La *bromadiolona* es muy estable y sus productos de degradación son la bromadiolona-cetona, [1,3-difenil-5-(4'-bromo-bifenil)penten-1-ol] y [1,3-difenil-5-(4'-bromo-bifenil)penten-1,5-diol]. El *difenacoum* se degrada muy lentamente al aire y no se han identificado productos de degradación. En cuanto al *brodifacoum*, tiene un tiempo de vida media superior a 60 días y sus productos de degradación son el dióxido de carbono (36% después de 56 semanas) y otros once compuestos de carbono no identificados ⁽¹³⁾.

4. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es evaluar la estabilidad de cuatro rodenticidas, *clorofacinona*, *bromadiolona*, *difenacoum* y *brodifacoum*, en muestras de suelos agrícolas de nuestra comunidad, en función de la temperatura, el tiempo y la concentración, e identificar, si fuese posible, los posibles productos de degradación, empleando como método de separación la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se emplearon detectores basados en la medida de la absorción molecular UV-Vis (DAD), fluorescencia (FLD), y para alcanzar límites de detección y cuantificación más bajos, también se empleó la espectroscopía de masas (MS).

5. EXPERIMENTAL

5.1. Instrumentación y reactivos

5.1.1. Reactivos

- Clorofacinona (CF): Pureza 98.4%; PESTANAL
- Bromadiolona (BD): Pureza 99.3%; PESTANAL
- Difenacoum (DF): Pureza 98.9%; PESTANAL
- Brodifacoum (BF): Pureza 99.2%; PESTANAL
- Metanol calidad HPLC (Prolabo)
- Formiato amónico 30 mM (Sigma-Aldrich)
- Agua nanopura obtenida con el sistema Milli-Ro y MilliQ de Millipore

5.1.2. Disoluciones

- Disoluciones patrón de 1000 mg/L de cada analito preparadas en metanol
- Patrones multicomponente diluidos con metanol a partir de los anteriores de las siguientes concentraciones: 36.00, 12.00, 6.00, 3.00, 1.50, 0.75, 0.30 y 0.15 mg/L

5.1.3. Material de laboratorio

- Material de vidrio de uso general
- Balanza analítica de precisión Mettler AE240
- pHmetro CRISON micropH 2001
- Sistema mecánico de agitación Vibromatic P Selecta
- Centrífuga Eppendorf 5810R y tubos de centrífuga
- Rotavapor Büchi R-210, baño de agua y bomba de vacío

- Equipo de ultrasonidos: Ultrasonds H-D Selecta P
- Equipo de filtración Phenomenex y filtros de nylon 0.45 μm
- Viales topacio

5.1.4. Equipo cromatográfico

Para la determinación de los cuatro rodenticidas en suelos agrícolas, se ha empleado un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de Agilent Technologies, modelo 1100, con detección de diodos alineados (DAD) y de fluorescencia (FLD), para las muestras más concentradas, y con espectrometría de masas (MS) para las muestras más diluidas, utilizando como analizador un cuadrupolo y realizando la ionización por electrospray (ESI) Este equipo está controlado por un software HP Chemstation. La separación se llevó a cabo empleando una Columna Gemini 5 μm C₁₈ 110Å (150 x 4,6mm) de Phenomenex. Los módulos que forman parte del equipo son:

- **Desgasificador:** consta de un contenedor de vacío de cuatro canales, que incluye una membrana tubular de plástico y una bomba de vacío. Esta bomba genera un ligero vacío que actúa en las cuatro cámaras del contenedor. De esta forma los gases disueltos de la fase móvil quedan eliminados al pasar a través de la membrana.
- **Bomba para gradientes cuaternarios:** el sistema está formado por una cabeza con una válvula de entrada y salida, una unidad de amortiguación y una válvula de purga. Proporciona una excelente mezcla de disolventes a baja presión, y está equipada con un sensor de fugas, con desconexión automática del equipo.
- **Muestreador automático** controlado electrónicamente: con un rango de inyección que va desde 0.1 a 100 μl y una bandeja de viales de 100 muestras de capacidad.
- **Compartimento de columna termostataado:** permite trabajar desde 10°C hasta 80°C con altas velocidades de refrigeración y calentamiento. Tiene un amplio interior, por lo que es posible introducir más de una columna.

- **Detector DAD**, diseñado para suministrar máximo rendimiento óptico. Incluye las siguientes características:
 - Lámparas de Deuterio y de Wolframio de larga duración para obtener la máxima intensidad y más bajo límite de detección en un rango de longitud de onda de 190-950 nm.
 - Modo de longitud de onda múltiple para los espectros en línea.
 - Rendija programable desde 1 a 16 nm para una total optimización de la sensibilidad, linealidad y resolución espectral.
 - Control de temperatura para mejorar la estabilidad de la línea base.
 - Filtro incorporado de óxido de holmio para una rápida verificación de la longitud de onda.

- **Detector FLD**:
 - Su fuente de luz es una lámpara flash de Xenón que produce un espectro continuo de luz desde 200 a 900nm. Permite obtener la máxima intensidad y los límites de detección más bajos.
 - Rango de longitud de onda del monocromador excitación de 200-700 nm, y del de emisión, de 280-900 nm.
 - Modo de longitud de onda múltiple para los espectros en línea.

- **Detector MS**:
 - Sistema de vacío que consta de una bomba mecánica y dos bombas turbo moleculares enfriadas por aire.
 - Generador de N₂ gaseoso. Consta de un sistema que transforma el aire comprimido en nitrógeno gaseoso mediante una mezcla de filtros y membranas de separación.
 - Sistema de introducción de la muestra. En este caso es el mismo equipo de HPLC.
 - Sistema de ionización. El equipo dispone de dos fuentes diferentes para llevar a cabo la ionización: API-electrospray e ionización química a presión atmosférica (APCI). En este estudio se empleó electrospray para realizar la ionización. Algunas de las características más importantes son:
 - Autocalibración y sintonización. Nos permite en el mismo análisis la detección de iones positivos y negativos.

- Capacidad multiseñal. Se puede medir en modo SIM (para la determinación cuantitativa) y en modo SCAN (para la determinación cualitativa).
- Analizador cuadrupolar hiperbólico de molibdeno.
- Detector de dínodo de alta energía.

5.2. Condiciones cromatográficas

Se tomó como referencia el trabajo de investigación sobre la determinación de rodenticidas en suelos, agua y tejido animal, realizado por Alma M. Hernández ⁽¹⁾ y el grupo de investigación TESEA. En el citado trabajo, se lleva a cabo la optimización de las condiciones cromatográficas para una adecuada identificación y cuantificación de los analitos (CF, BD, DF y BF) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Las condiciones de separación y detección seleccionadas fueron las siguientes:

- Columna: Gemini 5 μ m C₁₈ 110 A (150 x 4.6 mm) (Phenomenex)
- Fase móvil en régimen isocrático con un 73% de metanol y un 27% de formiato amónico 30 mM (pH=6.5)
- Flujo de fase móvil: 1.0 ml/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Volumen de inyección: 20 μ l
- Longitud de onda para la detección de BD, DF y BF por FLD
 - De excitación: 263 nm
 - De emisión: 390 nm
- Longitud de onda para la detección de CF por DAD: 285 nm
- Condiciones de detección por MS (para las muestras diluidas):
 - Ionización ESI en modo negativo
 - Temperatura de gas secante (N₂): 350°C
 - Flujo de gas secante (N₂): 10 ml/min
 - Presión de nebulización: 50 psi
 - Voltaje del capilar: 3500 V
 - Voltaje del fragmentador: 320 V (Modificado respecto al trabajo inicial)

El empleo de detectores acoplados se debe en primer lugar a que la CF, al no ser una molécula fluorescente, se debe detectar por absorción molecular; mientras que los otros tres compuestos (BD, DF y BF), al presentar fluorescencia, proporcionan una señal más intensa que por absorción, consiguiéndose límites de detección y cuantificación más bajos, que se podrían reducir aún más con el empleo de la espectrometría de masas como sistema de detección.

A continuación se muestran los espectros obtenidos con las condiciones cromatográficas anteriormente citadas e inyectando un patrón de 5mg/L en FLD y DAD para la determinación de las longitudes de onda de trabajo. En las *Figuras 2 y 3*, se muestran los espectros de excitación y emisión para BD, a modo de ejemplo. Para el resto de analitos eran idénticos.

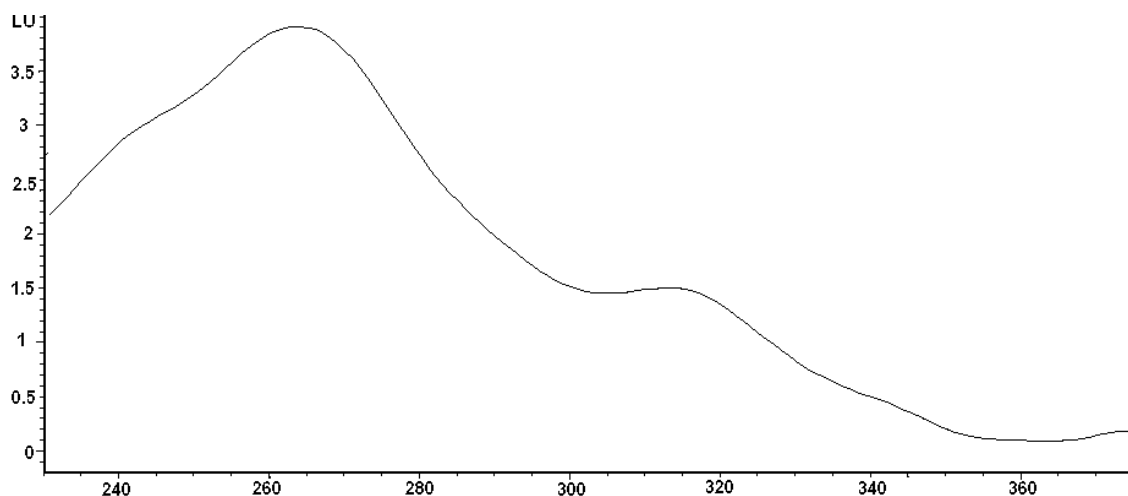


Figura 2. Espectro de excitación en FLD para BD

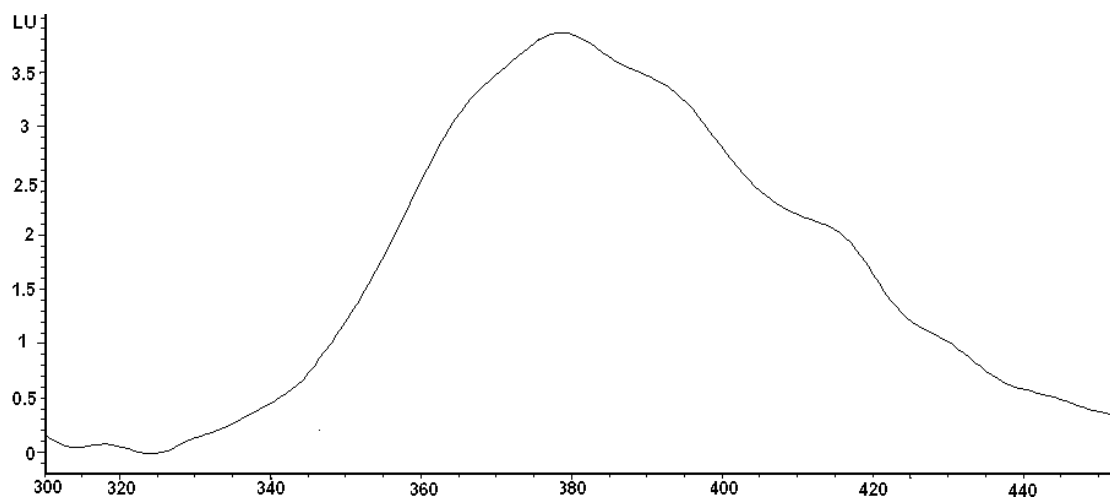


Figura 3. Espectro de emisión en FLD para BD

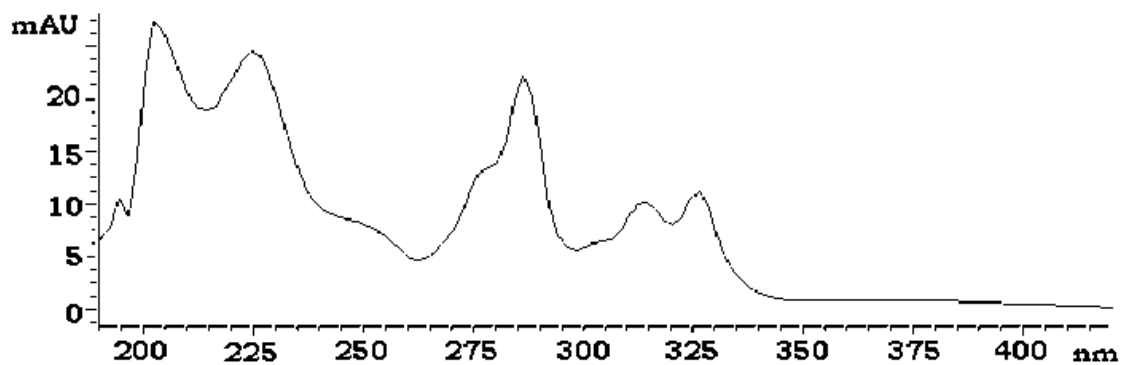


Figura 4. Espectro de absorción molecular en DAD para CF

Como se puede observar, la CF presenta una serie de máximos en la región entre 200-400nm, seleccionando el de 285nm por ser el que más sensibilidad proporciona. Para el resto de los analitos, se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y emisión a 263 y 390nm, respectivamente, para su detección por FLD.

Por otro lado, para encontrar los iones más abundantes para cuantificar los analitos por espectrometría de masas, se realizó un barrido en modo SCAN entre 100 y 700 unidades m/z, obteniendo los espectros mostrados a continuación.

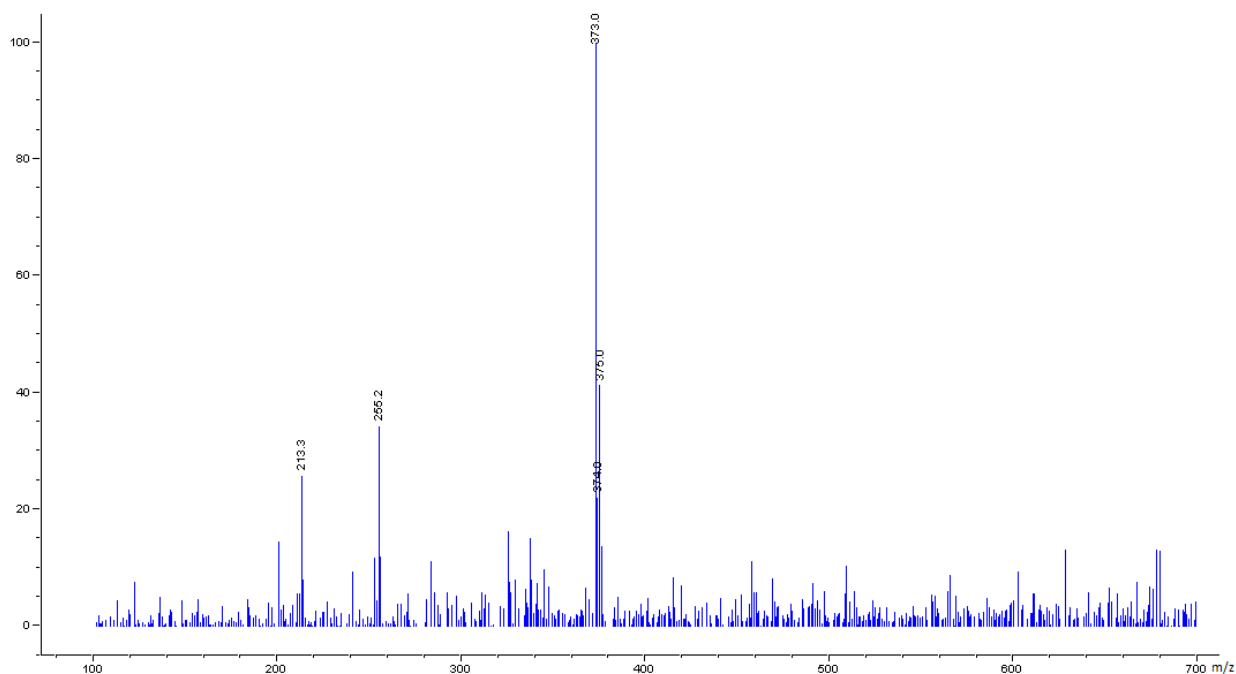


Figura 5. Espectro de masas de Clorofacinona

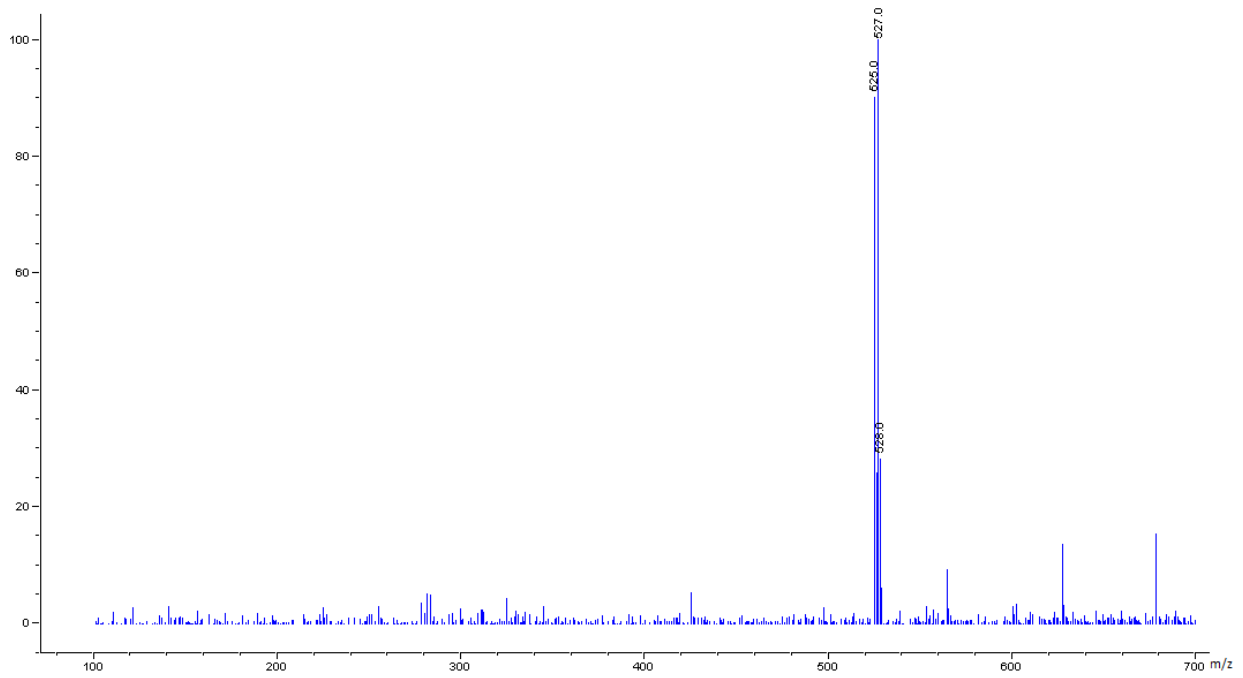


Figura 6. Espectro de masas de Bromadiolona

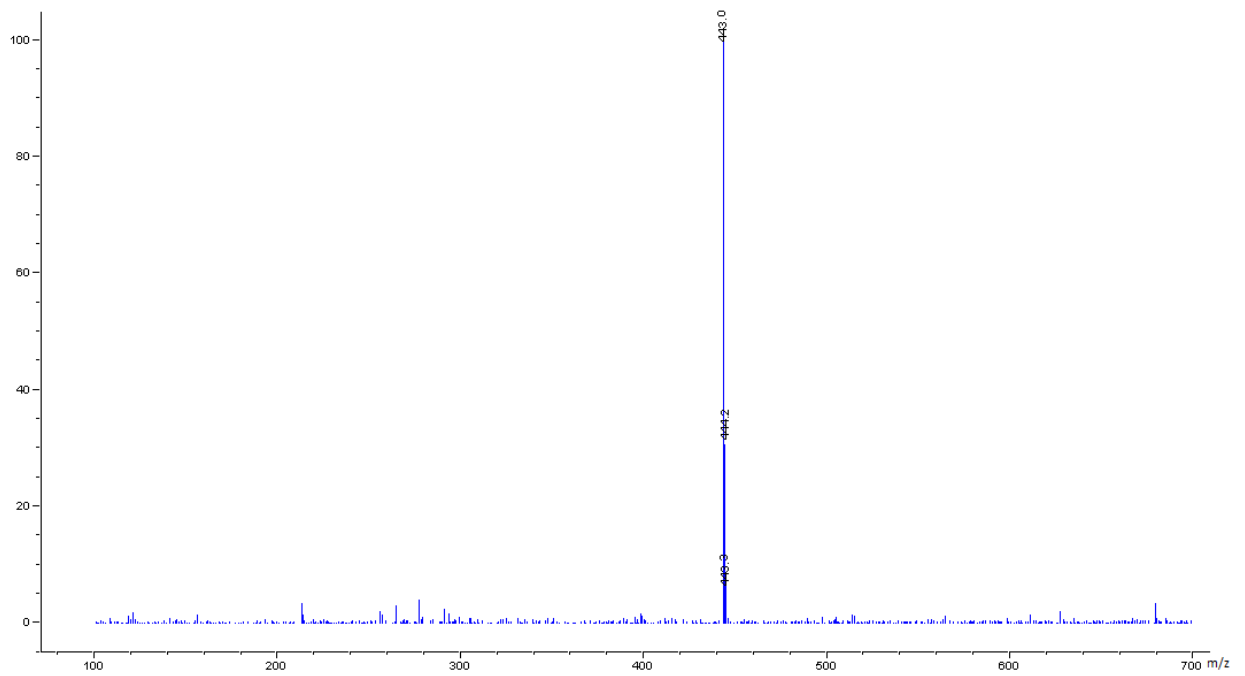


Figura 7. Espectro de masas de Difenacoum

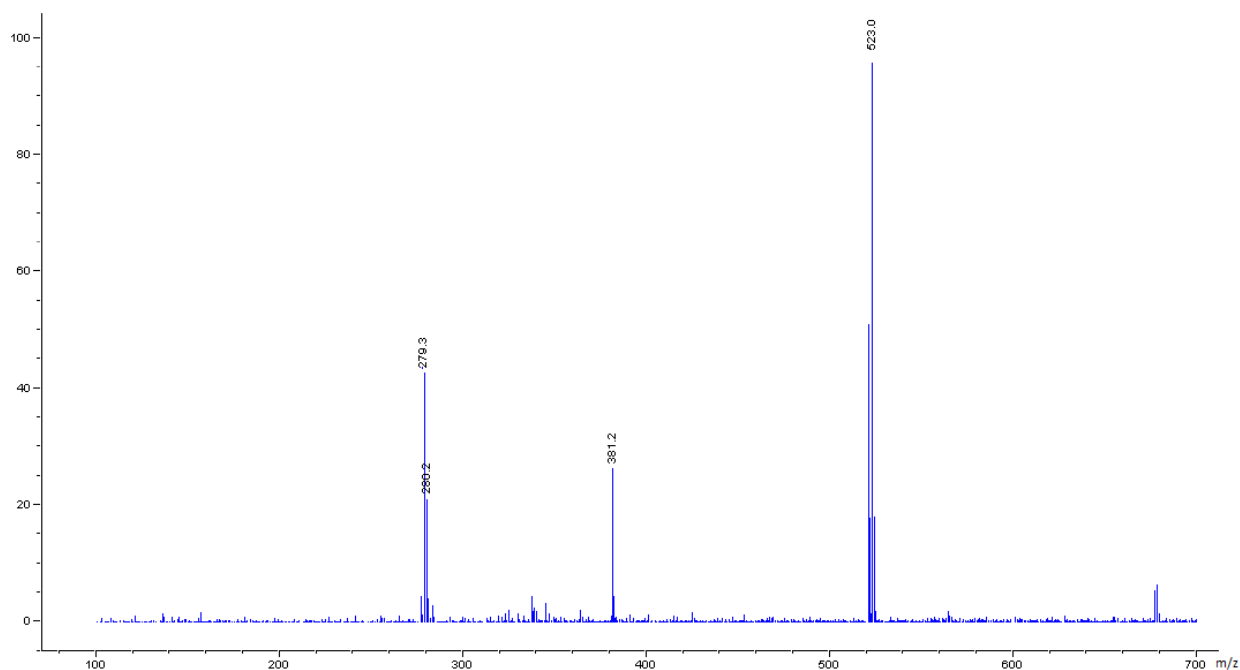


Figura 8. Espectro de masas de Brodifacoum

Los iones mayoritarios, que se emplean para la cuantificación de cada compuesto, se corresponden con el ion molecular [M-H]. En la *Tabla 1*, se recogen dichos iones y los iones de confirmación de cada analito.

Tabla 1. Iones seleccionados para la cuantificación de los analitos por detección ESI-MS en modo negativo e iones de confirmación. CF: Clorofacinona; BD: Bromadiolona; DF: Difenacoum; BF: Brodifacoum

<i>Analito</i>	Masas moleculares (g/mol)	Ion de cuantificación (m/z)	Iones de confirmación (m/z)
CF	374.82	373	213.3, 255.2
BD	528.11	527	525.0, 528.0
DF	444.52	443	443.2, 444.2
BF	524.42	523	279.3, 280.0, 381.2

A continuación, en la *Figura 9*, se muestran los cromatogramas correspondientes a la inyección de 20µl de un patrón en metanol en un sistema HPLC-DAD-FLD. Se puede observar que es posible cuantificar los cuatro analitos ya que los picos están totalmente resueltos. La CF no se puede detectar por FLD ya que no produce fluorescencia, pero la BD, DF y BF se detectan tanto por FLD como por DAD, aunque por DAD proporcionan una señal menos intensa.

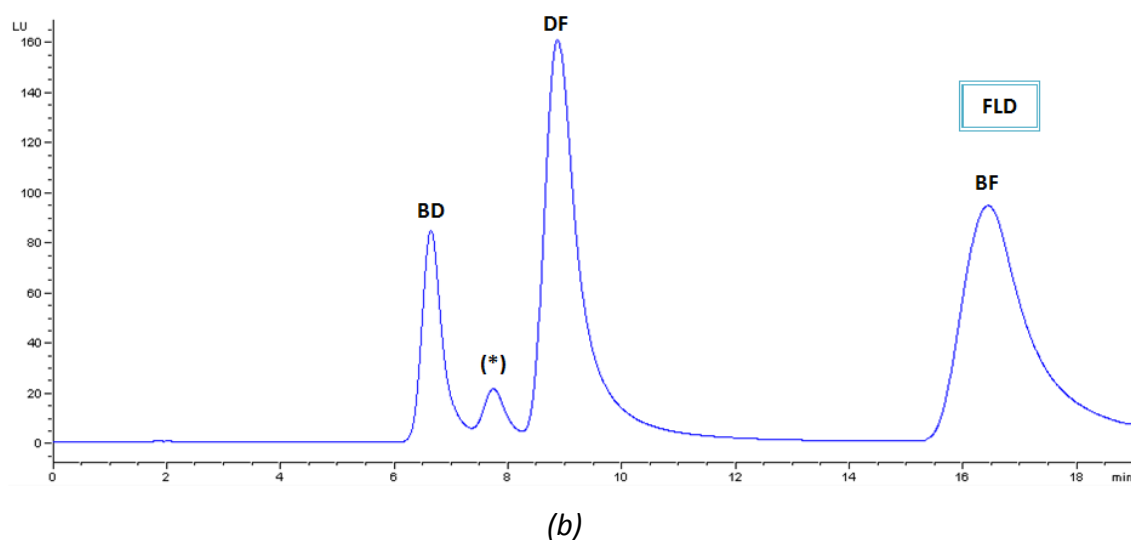
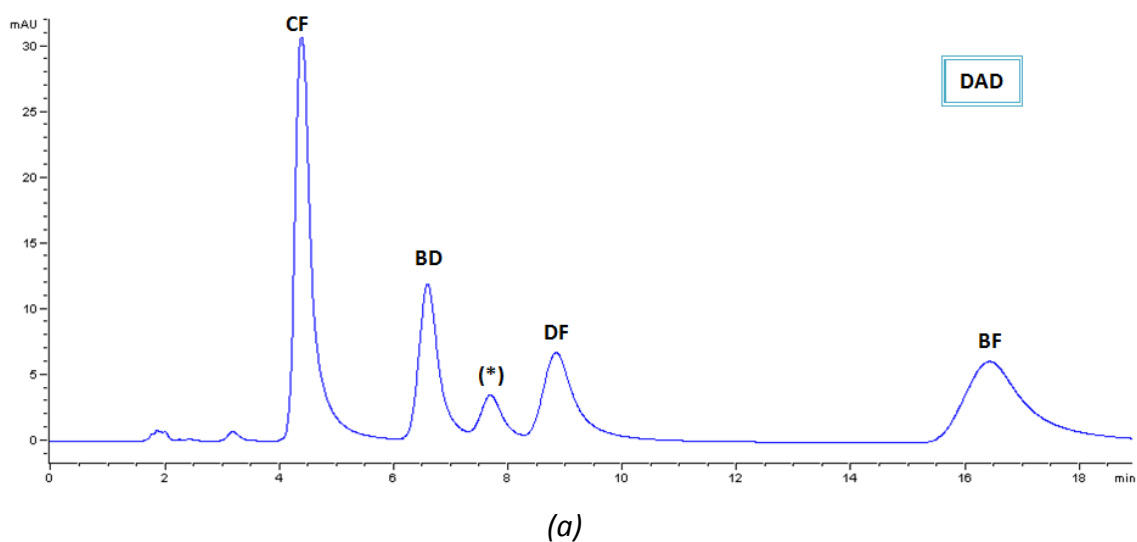


Figura 9. Cromatogramas de la disolución patrón en metanol de 30.0 mg/L obtenidos con detector (a) DAD y (b) FLD. El orden de elución de los analitos es: clorofacinona (CF), bromadiolona (BD), isómero de la bromadiolona (*), difenacoum (DF) y brodifacoum (BF).

Los tiempos de retención de cada analito se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Tiempos de retención de los analitos estudiados

ANALITO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
CF	4.30
BD	6.48
DF	8.57
BF	15.85

A continuación, en la *Figura 10* Se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma de iones extraídos obtenido al inyectar 20µl de un patrón en metanol en el sistema HPLC-MS.

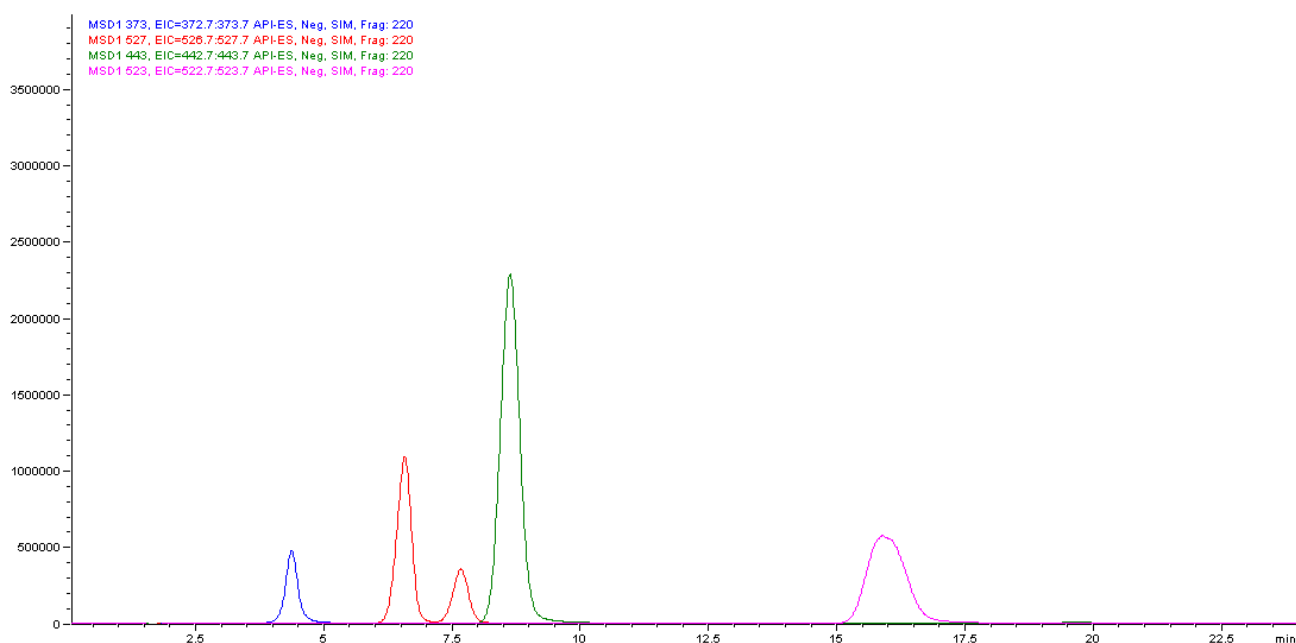


Figura 10. Cromatograma de la disolución patrón de 0.25mg/L con iones extraídos obtenido con espectrómetro de masas

5.3. Preparación de la muestra

Se empleó un suelo agrícola, proporcionado por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), para llevar a cabo el estudio de la estabilidad de cuatro rodenticidas anticoagulantes: clorofacinona, bromadiolona, difenacoum y brodifacoum. De este suelo, inicialmente se pesaron 1,5kg, los cuales se trituraron y tamizaron.

Una vez homogeneizado el suelo, se pesaron 16 muestras de aproximadamente 17g cada una en recipientes idénticos, que constituyeron las muestras de nuestro estudio. También se pesaron dos cantidades de suelo de 30g en otros dos recipientes, que nos sirvieron para preparar blancos de muestra y para realizar el calibrado en matriz, dado que el suelo suministrado estaba libre de rodenticidas, lo cual se comprobó inyectando una alícuota en el sistema cromatográfico.

Una vez realizada la división de las muestras, se introdujeron en un horno a 100°C durante 12 horas para secar el suelo, con el fin de eliminar la humedad, puesto que la experiencia debe realizarse sobre suelo seco.

A las 16 muestras de suelo seco se adicionan 3ml de soluciones patrón mezcla de los cuatro analitos en metanol de concentraciones 0.50, 5.00, 10.00 y 100.00 mg/L. Se mezcló bien para que la muestra fuese homogénea y, a continuación, una muestra de cada concentración se conservó a diferentes condiciones de temperatura para estudiar la estabilidad de los analitos:

- Frigorífico (4°C)
- Condiciones ambientales
- 20°C
- 30°C

Antes de la conservación de las muestras a dichas temperaturas, se pesó 1g de cada una de ellas con el fin de realizar un primer análisis a *tiempo cero*.

5.4. Tratamiento de muestra

Para llevar a cabo el estudio, se realiza el siguiente tratamiento de muestra:

A intervalos establecidos de tiempo, se pesó 1g de cada una de las 16 muestras en diferentes tubos de centrifuga, a los que se adicionaron 15ml de metanol (disolución extractante).

Las 16 muestras se sometieron a vibración continua durante 20 minutos a aproximadamente 700 U/min y, a continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 9.000 rpm y 10°C, con el fin de extraer los analitos desde el sólido al líquido.

Por último, se decantó el sobrenadante manualmente sobre un matraz de fondo redondo, y se concentró hasta sequedad en un rotavapor a 40°C. El residuo seco obtenido, se reconstituyó en 1ml de metanol con ayuda de un baño de ultrasonidos para facilitar la disolución.

A continuación, se transfiere el mililitro de metanol con los analitos extraídos a un vial para su posterior análisis en el equipo cromatográfico. Dicha disolución debe ser transparente, por lo que en ocasiones es necesario filtrarla a través de un filtro de nylon de 0,45µm en el vial de inyección.

Se evaluó la eficacia del proceso de extracción mediante el porcentaje de recuperación para cada uno de los analitos. Se estableció comparando la respuesta del

área de los patrones de suelo con los patrones en metanol a cuatro niveles de concentración. En la *Tabla 3* se muestran los porcentajes medios de recuperación de cada analito. Los resultados obtenidos variaban entre un 61 y 89 %, valores aceptables para estas concentraciones de los analitos en este tipo de muestras.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación medios de los analitos estudiados

ANALITO	%RECUPERACIÓN
CF	61.45%
BD	85.42%
DF	89.48%
BF	84.63%

5.5. Calibrado en metanol

Se realizó una línea de calibrado con los patrones en metanol. A partir de los patrones individuales de Clorofacinona, Bromadiolona, Difenacoum y Brodifacoum de 1000mg/L en metanol, se preparó una disolución mezcla de 100mg/L también en metanol, y por sucesivas diluciones, se prepararon el resto de las disoluciones patrón, cuyas concentraciones fueron de: 10.00, 5.00, 2.50, 1.25, 0.50, 0.25, 0.10 y 0.075 mg/L. Para obtener las líneas de calibrado en los sistemas de detección DAD y FLD se emplearon las cinco primeras concentraciones (altas concentraciones), y en el caso de la espectrofotometría de masas, las cuatro últimas (bajas concentraciones).

La cuantificación se realizó en base al área de cada pico, mediante el método de patrón externo y usando un ajuste de mínimos cuadrados. En las siguientes figuras, a modo de ejemplo se muestran las líneas de calibrado para un intervalo de concentraciones de 0.50 a 10mg/L (aunque el comportamiento es lineal hasta 30mg/L), para DAD y FLD.

Clorofacinona:

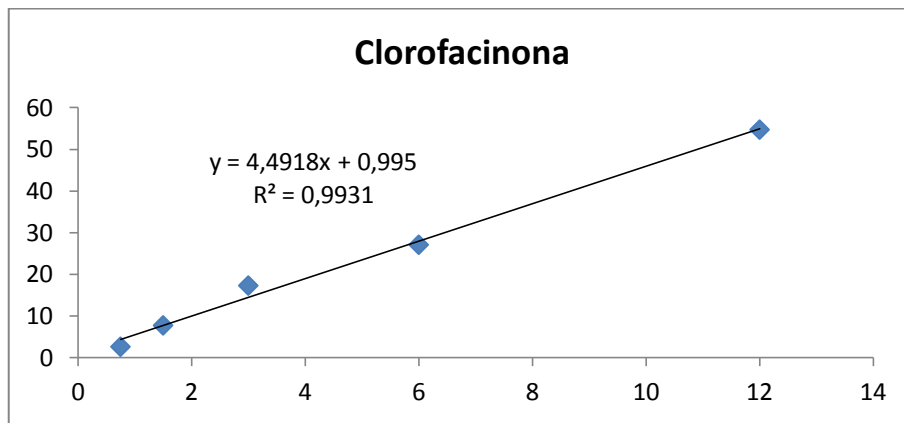


Figura 11. Línea de calibrado de clorofacinona en metanol

Bromadiolona:

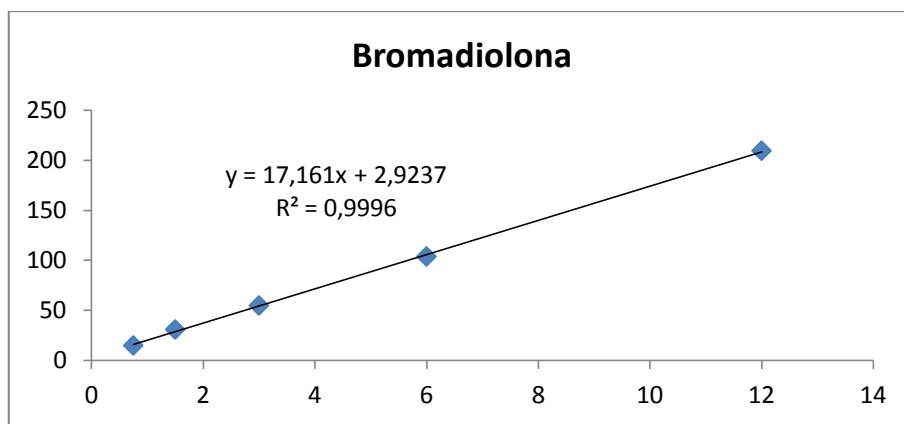


Figura 12. Línea de calibrado de bromadiolona en metanol

Difenacoum:

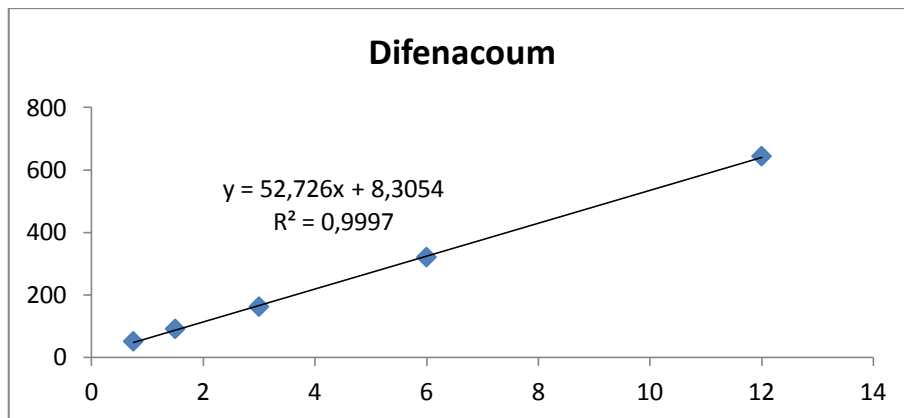


Figura 13. Línea de calibrado de difenacoum en metanol

Brodifacoum:

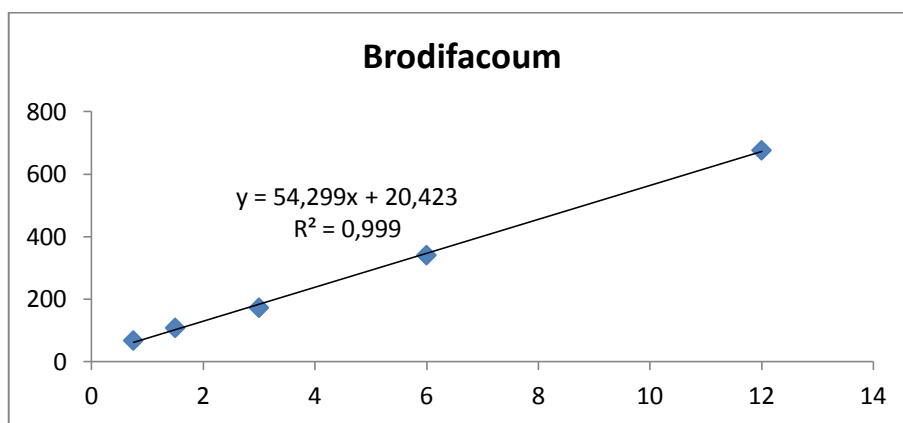


Figura 14. Línea de calibrado de brodifacoum en metanol

En la *Tabla 4* se muestran los resultados obtenidos de los análisis de regresión lineal de los cuatro analitos.

Tabla 4. Parámetros de las líneas de calibrado de clorofacinona (CF), bromadiolona (BD), difenacoum (DF) y brodifacoum (BF)

	Rango lineal (mg/L)	Ordenada	Pendiente	r^2
CF	0.75-30.00	0.995	4.492	0.9931
BD	0.75-30.00	2.924	17.161	0.9996
DF	0.75-30.00	8.305	52.726	0.9997
BF	0.75-30.00	20.423	54.299	0.9990

Se aplicó la *prueba t* para verificar la tendencia de la regresión, ya que para asumir una tendencia lineal se ha de cumplir que t_{exp} sea superior a t_{tab} , obteniéndose la t_{exp} mediante el cociente entre el valor de la pendiente (b) de la recta y la desviación estándar de la misma (s_b). La t_{tab} es la *t-Student* obtenida para $n-2$ grados de libertad y una probabilidad de 0.95.

En todos los casos se cumple que la $t_{exp} > t_{tab}$, por lo tanto se acepta que el método es lineal y la ausencia de bias. Los valores del coeficiente de determinación (r^2), eran para todos los casos mayores de 0.99, lo que indica la bondad del ajuste del calibrado.

De manera análoga se obtuvieron las líneas de calibrado en el caso del MS, observándose un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiado (0.075-0.50mg/L).

Debido a la experiencia que posee el grupo de trabajar con espectrofotometría de masas, a continuación se llevo a cabo un estudio de la matriz sobre la señal del detector de masas (efecto matriz).

Para ello, un blanco de muestra (sin analitos) fue sometido al tratamiento de muestra antes descrito, adicionándole a continuación la mezcla de los analitos. Tras su inyección en el sistema cromatográfico se compararon las señales obtenidas para cada uno de los analitos con las obtenidas al inyectar las mezclas patrón en metanol, observándose que se producía una supresión en la señal atribuible a la presencia de la matriz. En la *Tabla 5* se muestra el tanto por ciento de supresión para cada uno de los analitos estudiados. Como se puede observar, la mayor pérdida de señal debida a la matriz se produce sobre el compuesto más retenido.

Tabla 5. Porcentajes de supresión de la señal de cada analito debida a la matriz

Analitos	%Supresión de la señal
CF	10%
BD	35%
DF	40%
BF	47%

Por este motivo, para llevar a cabo la cuantificación correcta de los compuestos mediante espectrofotometría de masas se precisa realizar un calibrado sobre la matriz.

Se comprobó que en el caso de emplear los detectores de absorción, este fenómeno no se producía. No obstante se llevó a cabo para todos los sistemas de detección la calibración en matriz para así evitar realizar cálculos debidos a los porcentajes de recuperación del tratamiento de muestra.

5.6. Calibrado en matriz

Se adicionaron a muestras de aproximadamente 1g de suelo tamizado y seco, 0.5ml de cada una de las disoluciones patrón preparadas en metanol y se sometieron al tratamiento de muestra anteriormente explicado. De modo que las concentraciones de estos patrones son las mostradas en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Concentración de las disoluciones patrón en suelo

Código del patrón	Concentración (mg/L)
S-0	0.040
S-1	0.125
S-2	0.250
S-3	0.625
S-4	1.250
S-5	2.500
S-6	5.000
S-7	15.000

También se preparó un blanco, pesando 1g de muestra al que no se le adicionaron los analitos estudiados, y sometiéndolo al mismo tratamiento de muestra descrito. En las siguientes figuras se muestra en rojo el cromatograma obtenido al analizar el blanco, y en azul el cromatograma de un patrón en suelo. Como se puede observar al superponer los cromatogramas, no aparece ninguna señal a los tiempos de retención de los analitos que nos impida su correcta cuantificación.

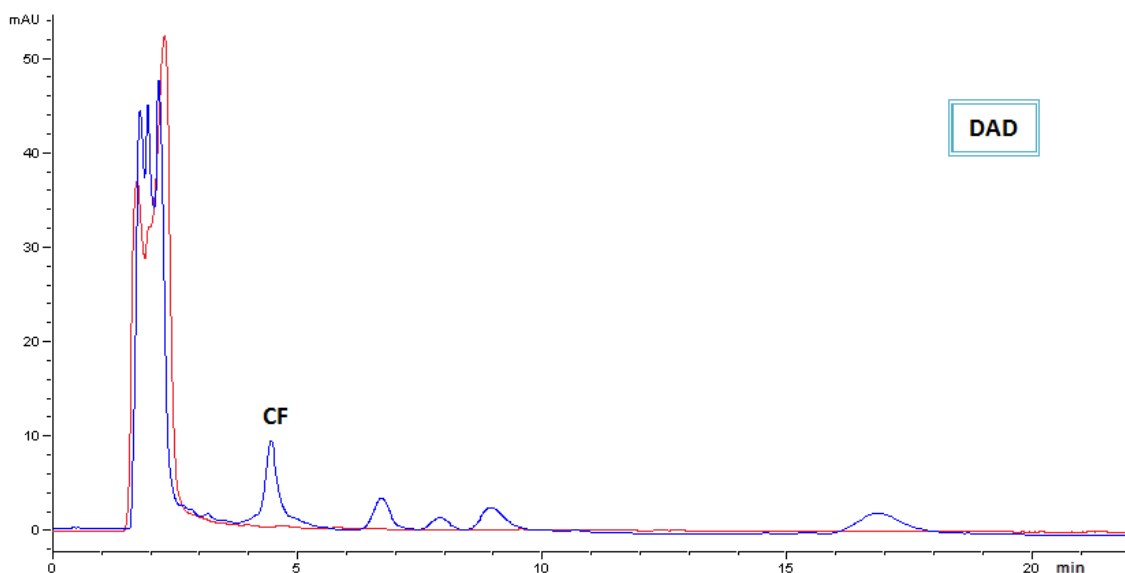


Figura 15. Cromatogramas DAD de un blanco (rojo) y un patrón en suelo (azul)

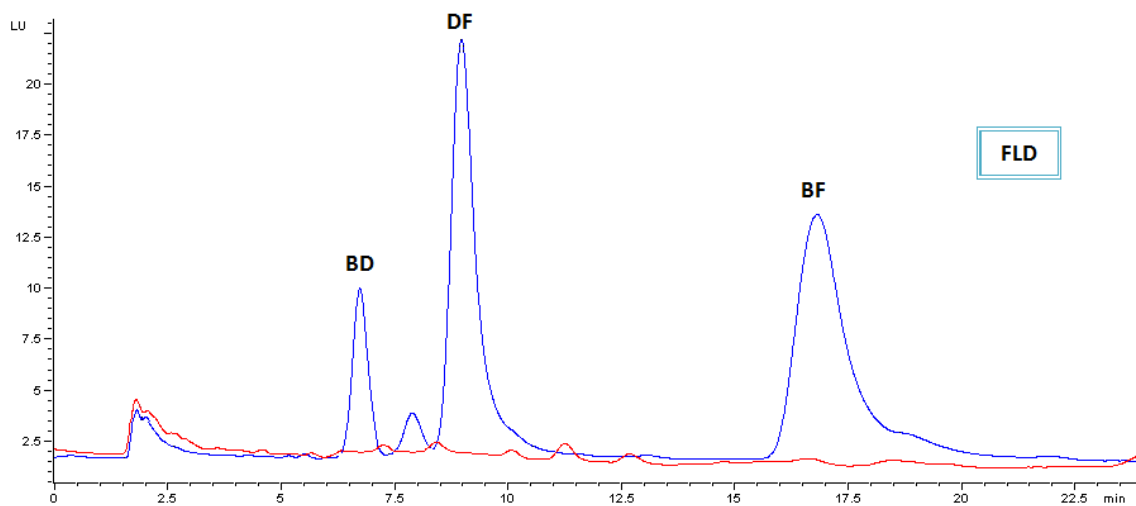


Figura 16. Cromatogramas FLD de un blanco (rojo) y un patrón en suelo (azul)

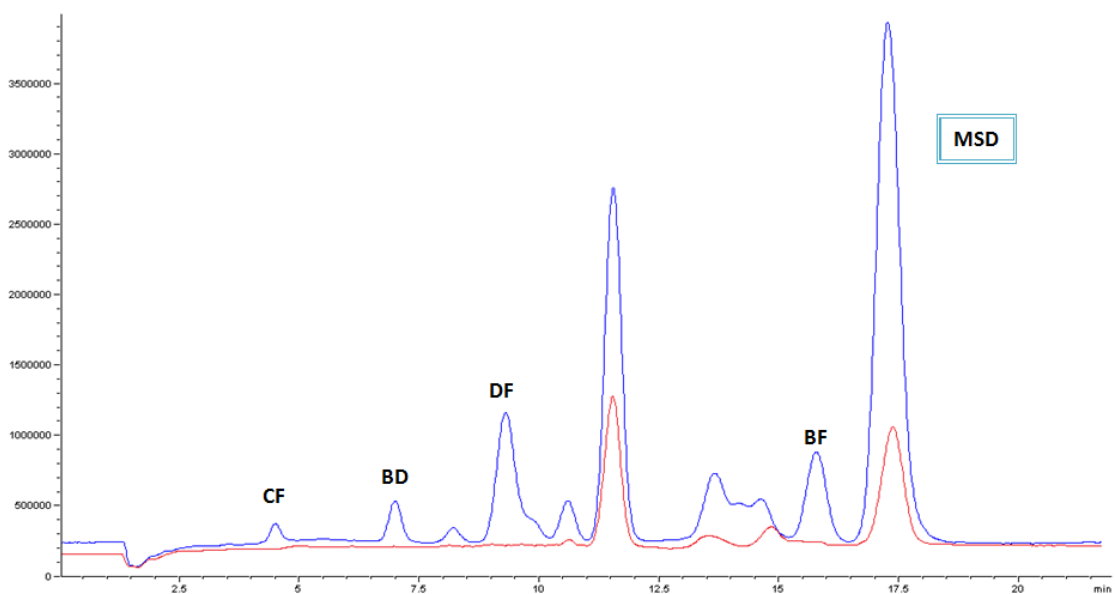


Figura 17. Cromatogramas MSD en modo TIC de un blanco (rojo) y un patrón en suelo (azul)

La cuantificación se realizó en base al área de cada pico. Se realizaron dos líneas de calibrado para cada analito, como se ha indicado anteriormente: los patrones más concentrados se analizaron por DAD-FLD, y los más diluidos con un espectrómetro de masas (debido a que permite alcanzar límites de detección y cuantificación más bajos). En la *Tabla 7* se muestran los intervalos de concentración de las líneas de calibrado y los patrones empleados a altas y bajas concentraciones.

Tabla 7. Intervalos de concentración del calibrado en matriz

	Patrones empleados	Intervalo de concentraciones
Baja concentración	De S-0 a S-4	0.05-1.50 µg/g
Alta concentración	De S-4 a S-7	1.50-18.00 µg/g

En las siguientes figuras se muestran las líneas de calibrado obtenidas para cada analito a bajas y altas concentraciones.

Clorofacinona:

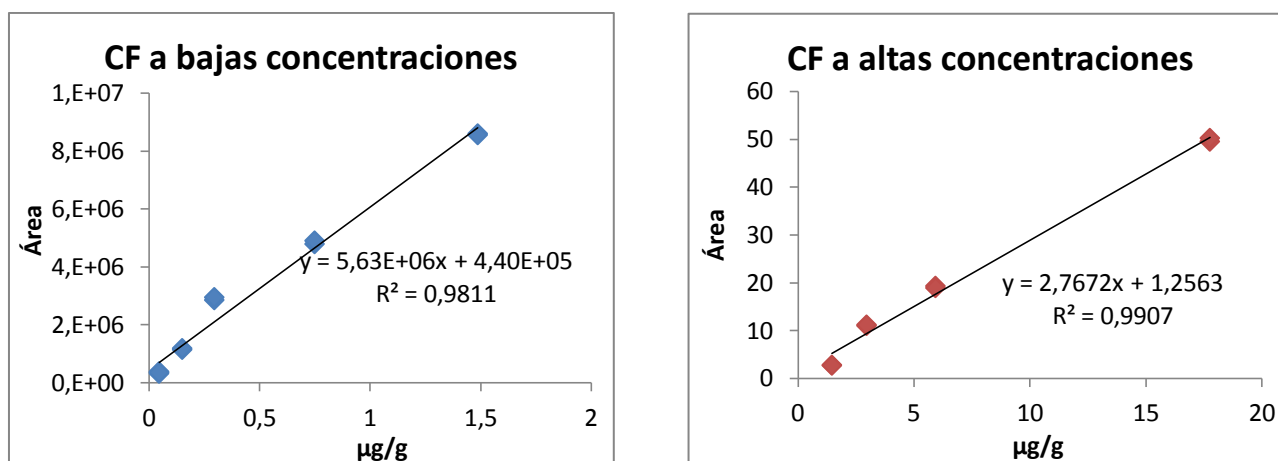


Figura 18. Calibrado de clorofacinona en matriz

Bromadiolona:

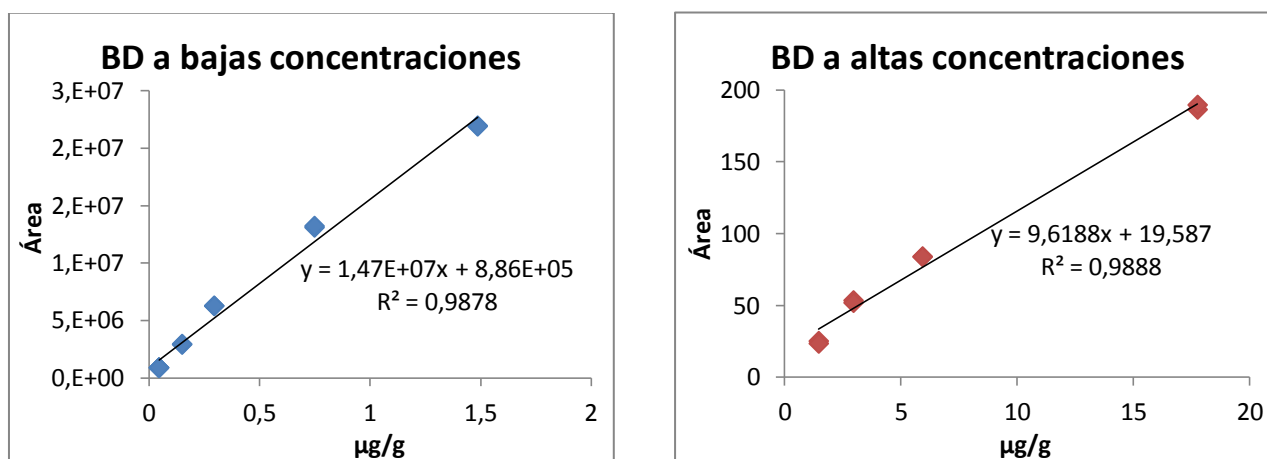


Figura 19. Calibrado de bromadiolona en matriz

Difenacoum:

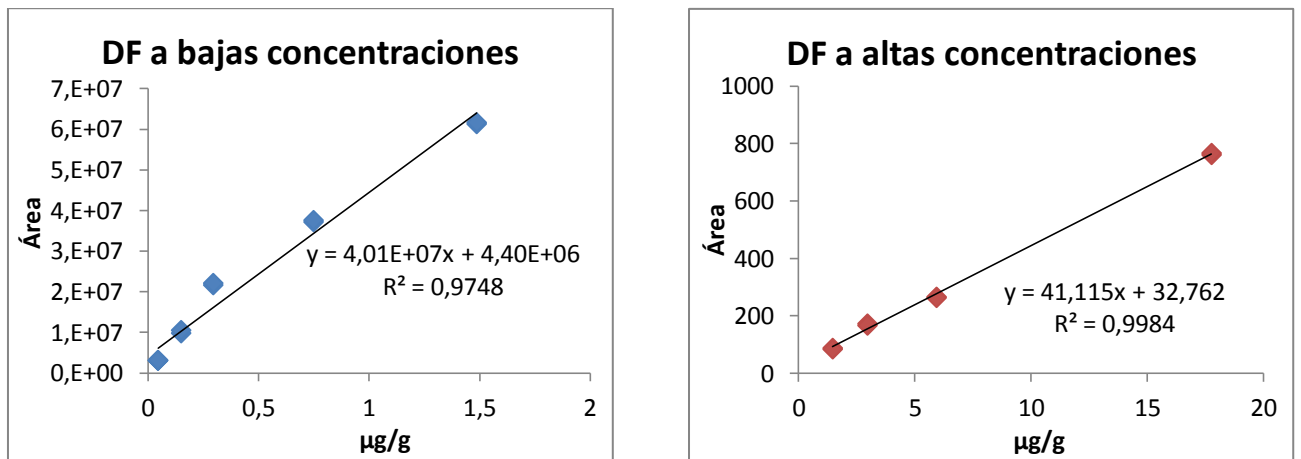


Figura 20. Calibrado de difenacoum en matriz

Brodifacoum:

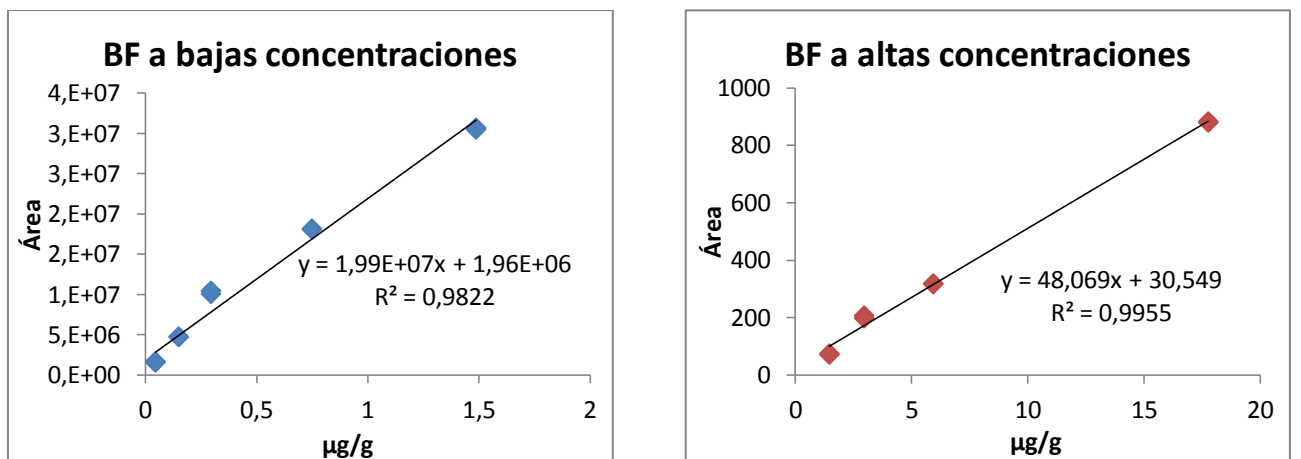


Figura 21. Calibrado de brodifacoum en matriz

Se realizó una prueba t para verificar la tendencia de la regresión de manera análoga al caso de los calibrados en patrón, observándose que el método era lineal en el intervalo estudiado.

6. RESULTADOS

Como ya se ha comentado en los *Objetivos de Trabajo*, se ha intentado determinar la estabilidad de clorofacinona, bromadiolona, difenacoum y brodifacoum en suelos agrícolas, a diferentes concentraciones y temperaturas.

Para ello, se siguió el procedimiento descrito anteriormente en la *Preparación y Tratamiento de muestra*.

Para este estudio de estabilidad se han realizado un total de 8 tomas de muestra repartidas a lo largo de 8 semanas, donde dentro de cada semana se ha realizado una única toma.

La toma de muestra consistió en pesar aproximadamente 1g de cada una de las 16 muestras preparadas y conservadas en diferentes condiciones de temperatura, y someterlas al tratamiento de muestra descrito.

El objetivo principal establecido, fue intentar determinar si, a lo largo de esas 8 semanas, se producía una disminución de la concentración de los analitos en las diferentes muestras adicionadas, tratando de comprobar si, en determinadas condiciones de concentración y/o temperatura, esta degradación se producía de manera más o menos significativa.

El estudio de la estabilidad se realizó tanto a altas concentraciones como a bajas. En el caso de las muestras de menor concentración, analizadas mediante masas, los resultados demostraron que los analitos permanecían estables en las diferentes condiciones de almacenamiento; mientras que los resultados de las muestras más concentradas, analizadas mediante DAD y FLD, indicaban una mayor pérdida de los analitos. En las *Figura 22* se muestran las tendencias de cada analito a las diferentes condiciones de temperatura para las muestras a las cuales se le adicionado la mayor concentración de analitos.

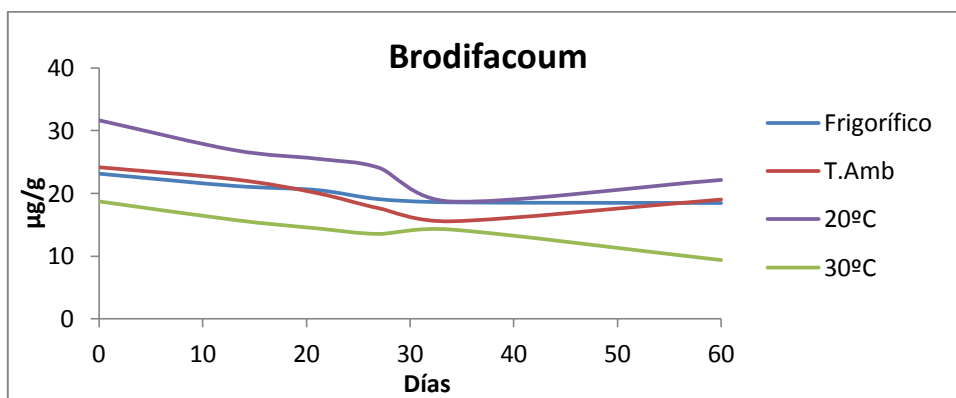
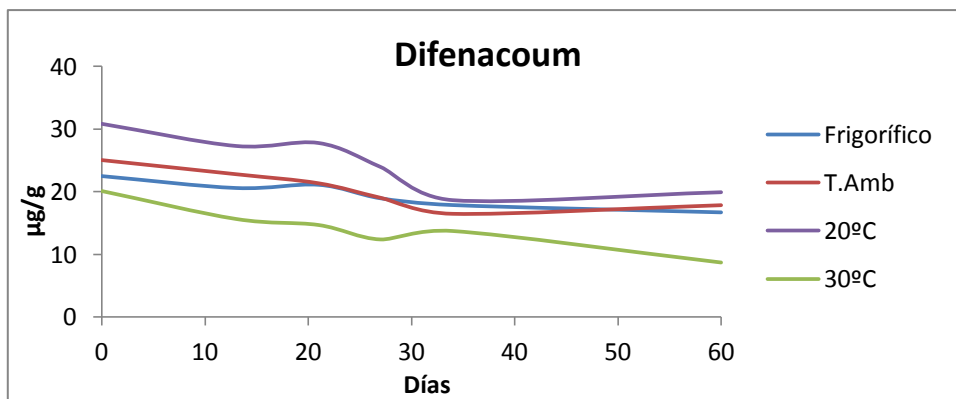
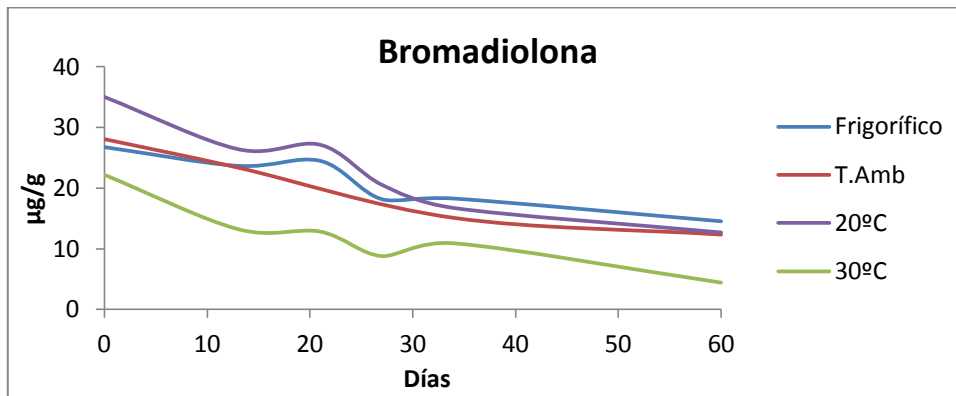
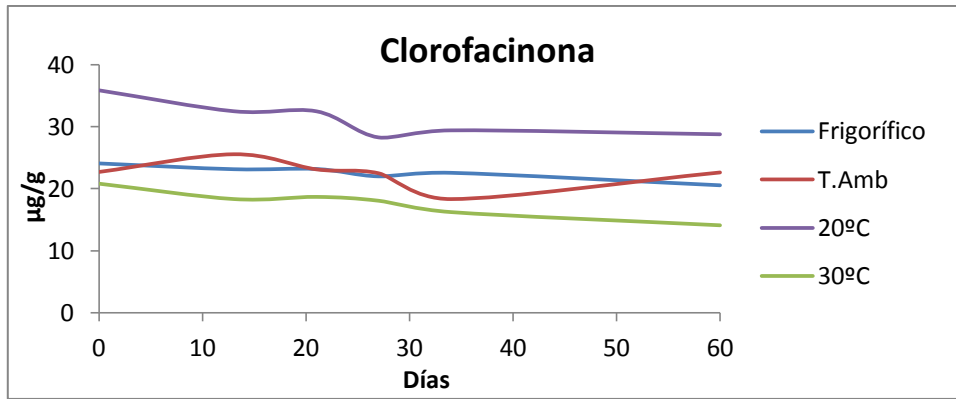


Figura 22. Estabilidad de colorofacinona, bromadiolona, difenacoum y brodifacoum adicionadas a un suelo en alta concentración

En la *Tabla 8* se recogen los porcentajes de pérdida de cada analito a las distintas condiciones de temperatura, donde se puede observar que la Bromadiolona se degrada con mayor rapidez que el resto de analitos, y que la Clorofacinona es el compuesto más estable.

Tabla 8. Porcentajes de pérdida de los analitos estudiados después de 60 días

Analito	Frigorífico (4°C)	Condiciones ambientales	20°C	30°C
CF	10.37%	14.50%	19.82%	32.21%
BD	45.71%	55.94%	63.85%	79.96%
DF	25.75%	28.72%	35.37%	56.78%
BF	20.21%	21.30%	30.08%	49.89%

A 30°C la degradación es más rápida. En las siguientes figuras se muestran las gráficas de degradación de cada analito a dicha temperatura.

Clorofacinona:

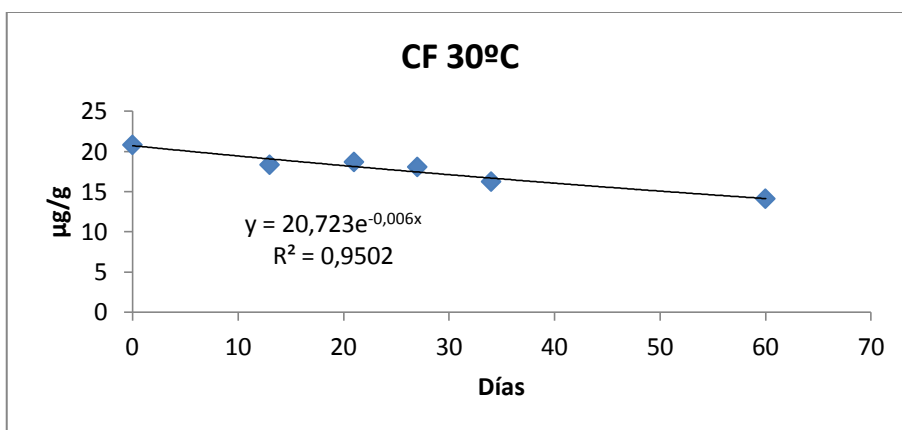


Figura 23. Estabilidad de clorofacinona a 30°C

Bromadiolona:

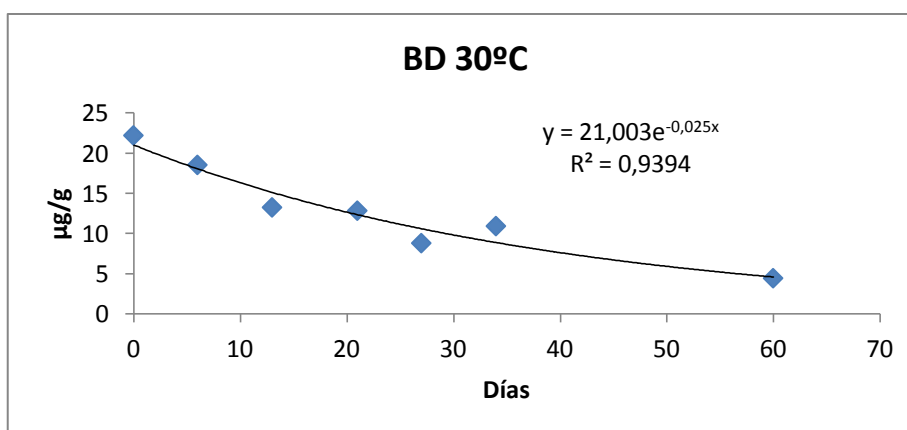


Figura 24. Estabilidad de bromadiolona a 30°C

Difenacoum:

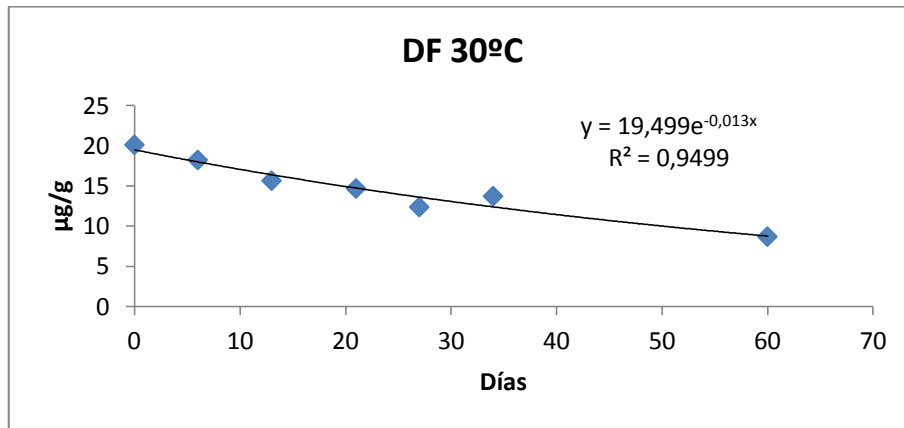


Figura 25. Estabilidad de difenacoum a 30°C

Brodifacoum:

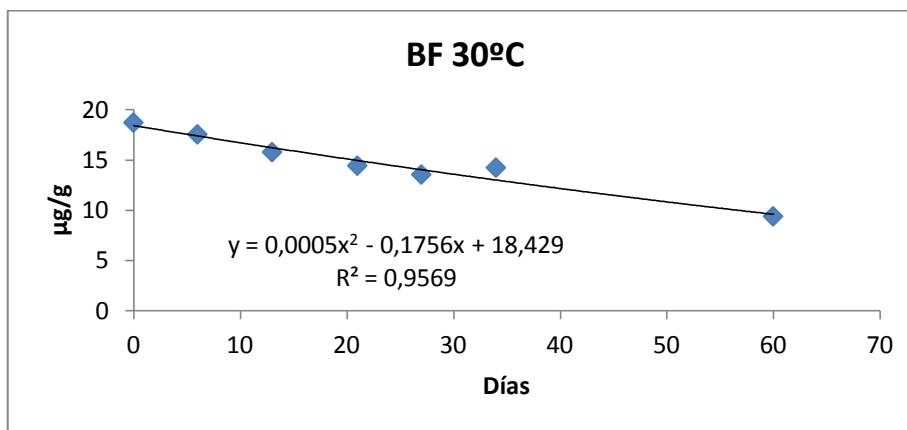
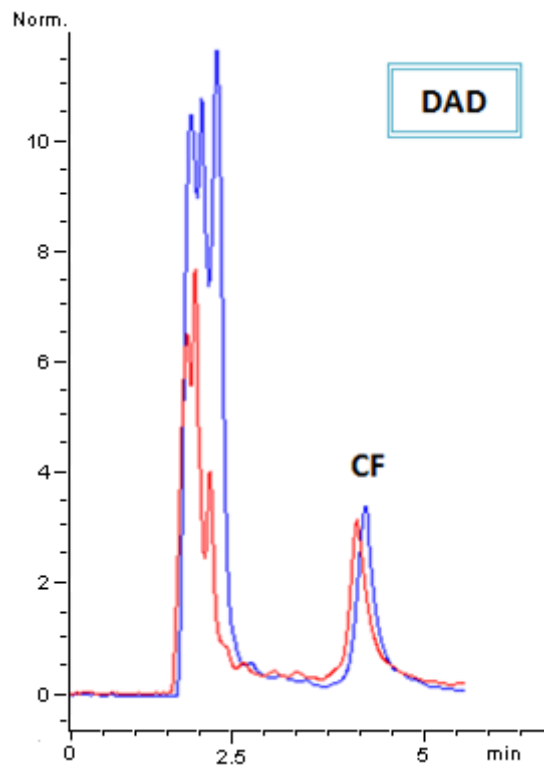


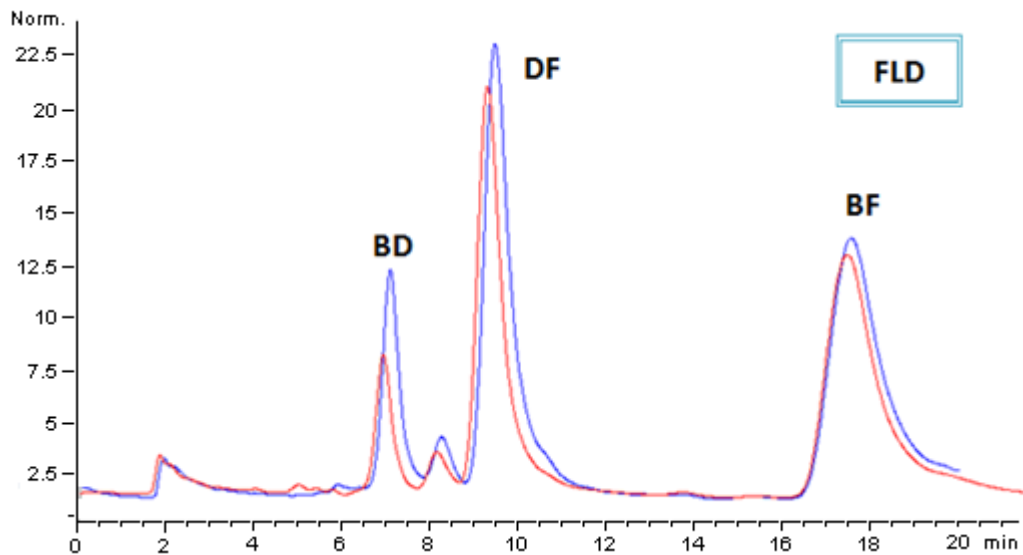
Figura 26. Estabilidad de brodifacoum a 30°C

Como se indica en las gráficas, la degradación del *Brodifacoum* viene descrita por una función polimérica; y el resto de los analitos (*Clorofacinona*, *Bromadiolona* y *Difenacoum*), se degradan de forma exponencial. Todos estos datos se deberían confirmar con mayor número de datos

Como ya he comentado antes, y como se observa en las gráficas, la *Bromadiolona* se degrada con mayor rapidez que el resto de analitos. Esto mismo se puede ver al superponer los cromatogramas de la primera y última toma de muestra, que se muestran en la *Figura 27*.



(a)



(b)

Figura 27. Cromatogramas de la muestra conservada a 30°C de la toma 1 (azul) y 7 (rojo), obtenidos con detector (a) DAD y (b) FLD

En el tiempo que duró este estudio, no fue posible identificar ningún compuesto de degradación. Como se observa en la *Figura 27*, los cromatogramas que se obtuvieron en la primera y última toma de muestra son idénticos, salvo por la disminución del área de los picos. No aparece ninguna señal nueva.

Estas muestras también fueron inyectadas en sistema HPLC-MS en modo SCAN no observándose ningún pico extra que nos indujera a pensar a la presencia de posibles metabolitos o productos de degradación. Este hecho también podría ser debido a que estos posibles compuestos se encontraran por debajo del límite de detección de la técnica.

7. CONCLUSIONES

1. Los compuestos estudiados (*Clorofacinona*, *Bromadiolona*, *Difenacoum* y *Brodifacoum*) fueron estables en suelos agrícolas en concentración de 0.04 a 0.625mg/L, a todas las temperaturas estudiadas.

2. Cuando se añadieron al suelo en concentración 1.25, 2.50, 5.00 y 15.00mg/L, los resultados obtenidos mostraron que a 30°C la degradación de los cuatro analitos es mayor, llegando a alcanzar un porcentaje de pérdida de 79.96% en el caso de la *bromadiolona*, para la mayor concentración estudiada.

3. No ha sido posible detectar ningún producto de degradación.

8. Bibliografía

1. **Alma M. Hernández.** *Análisis de rodenticidas por HPLC en suelo, agua y tejido animal.* Trabajo Fin de Máster. Universidad de Valladolid (2013).
2. **R. Fernadez Lechón, M. D. Soto Torres.** *Plagas biológicas en agricultura: soluciones y alternativas.* Departamento de Economía Aplicada, Universidad de Valladolid.
3. **Javier Viñuela, Alfonso Paz, David de la Bodega, Carlos Cuellar Basterrechea, Juan Antonio Fargallo, Jesús Herranz, Manuel B. Morales, Fernando Jubete, Rafael Mateo, Juan José Oñate, Pedro Olea, y Jesús García.** *Situación actual de las plagas de topillo campesino en Castilla y León.* 2014.
4. **Virginie Vandebroucke, Noël Desmet, Patrick De Backer, Siska Croubels.** *Multi-residue analysis of eighth anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography B, 869 (2008), 101-110.
5. **Mine G. Palazoglu, Elizabeth R. Tor, Dirk M. Holstege, and Francis D. Galey.** *Multiresidue analysis of nine anticoagulant rodenticides in serum.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (1998), 4260-4266.
6. **M. Z. Mesmer, R. A. Flurer.** *Determination of chlorphacinone and diphacinone in commercial rodenticides by liquid chromatography-UV detection and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 891 (2000). 249-255..
7. **Daljit Vudathala, Margaret Cummings, and Lisa Murphy.** *Analysis of multiple anticoagulant rodenticides in animal blood and liver tissue using principles of QuEChERS method.* Journal of Analytical Toxicology, 34 (2010), 273-279.
8. **A. Medvedovici, F. David, P. Sandra.** *Determination of the rodenticides warfarin, diphenadione and chlorphacinone in soil samples by HPLC-DAD.* Talanta 44 (1997), 1633-1640.

9. **Leetta J. Marek, William C. Koskinen.** *Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray/Mass Spectrometry.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (2007), 571-576.

10. **Alma M. Hernández, José Bernal, José L. Bernal, María T. Martín, Constantino Caminero, María J. Nozal.** *Simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides in soil and water by LC-ESI-MS.* Journal of Separation Science, 36 (2013), 2593-2601.

11. **Kofi Opong-Mensah, William R. Porter.** *Separation of some rodenticides and related compounds by thin-layer chromatography.* Journal of Chromatography, 455 (1988), 439-443.

12. **Mi-Cong Jin, Xiao-Hong Chen, Yang Zhu.** *Determination of five 4-hydroxycoumarin rodenticides in animal liver tissues by ion chromatography with fluorescence detection.* Journal of Chromatography A, 1155 (2007), 57-61..

13. <http://www.co.thurston.wa.us/health/ehipm/>.

9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Listado de Tablas

TABLA 1. IONES SELECCIONADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ANALITOS POR DETECCIÓN ESI-MS EN MODO NEGATIVO E IONES DE CONFIRMACIÓN. CF: CLOROFACINONA; BD: BROMADIOLONA; DF: DIFENACOUM; BF: BRODIFACOUM.....	13
TABLA 2. TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS	14
TABLA 3. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN MEDIOS DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS.....	17
TABLA 4. PARÁMETROS DE LAS LÍNEAS DE CALIBRADO DE CLOROFACINONA (CF), BROMADIOLONA (BD), DIFENACOUM (DF) Y BRODIFACOUM (BF)	19
TABLA 5. PORCENTAJES DE SUPRESIÓN DE LA SEÑAL DE CADA ANALITO DEBIDA A LA MATRIZ	20
TABLA 6. CONCENTRACIÓN DE LAS DISOLUCIONES PATRÓN EN SUELO.....	21
TABLA 7. INTERVALOS DE CONCENTRACIÓN DEL CALIBRADO EN MATRIZ	23
TABLA 8. PORCENTAJES DE PÉRDIDA DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS DESPUÉS DE 60 DÍAS	27

Listado de Figuras

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS RODENTICIDAS ESTUDIADOS.....	4
FIGURA 2. ESPECTRO DE EXCITACIÓN EN FLD PARA BD.....	10
FIGURA 3. ESPECTRO DE EMISIÓN EN FLD PARA BD.....	10
FIGURA 2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR EN DAD PARA CF	11
FIGURA 5. ESPECTRO DE MASAS DE CLOROFACINONA.....	11
FIGURA 6. ESPECTRO DE MASAS DE BROMADIOLONA	12
FIGURA 7. ESPECTRO DE MASAS DE DIFENACOUM	12
FIGURA 8. ESPECTRO DE MASAS DE BRODIFACOUM.....	13
FIGURA 9. CROMATOGRAMAS DE LA DISOLUCIÓN PATRÓN EN METANOL DE 30.0 MG/L OBTENIDOS CON DETECTOR (A) DAD Y (B) FLD. EL ORDEN DE ELUCIÓN DE LOS ANALITOS ES: CLOROFACINONA (CF), BROMADIOLONA (BD), ISÓMERO DE LA BROMADIOLONA (*), DIFENACOUM (DF) Y BRODIFACOUM (BF).	14
FIGURA 10. CROMATOGRAMA DE LA DISOLUCIÓN PATRÓN DE 0.25MG/L CON IONES EXTRAÍDOS OBTENIDO CON ESPECTRÓMETRO DE MASAS	15
FIGURA 11. LÍNEA DE CALIBRADO DE CLOROFACINONA EN METANOL.....	18
FIGURA 12. LÍNEA DE CALIBRADO DE BROMADIOLONA EN METANOL	18
FIGURA 13. LÍNEA DE CALIBRADO DE DIFENACOUM EN METANOL	18
FIGURA 14. LÍNEA DE CALIBRADO DE BRODIFACOUM EN METANOL.....	19
FIGURA 15. CROMATOGRAMAS DAD DE UN BLANCO (ROJO) Y UN PATRÓN EN SUELO (AZUL)	21
FIGURA 16. CROMATOGRAMAS FLD DE UN BLANCO (ROJO) Y UN PATRÓN EN SUELO (AZUL).....	22
FIGURA 17. CROMATOGRAMAS MSD EN MODO TIC DE UN BLANCO (ROJO) Y UN PATRÓN EN SUELO (AZUL)	22
FIGURA 18. CALIBRADO DE CLOROFACINONA EN MATRIZ	23

FIGURA 19. CALIBRADO DE BROMADIOLONA EN MATRIZ.....	23
FIGURA 20. CALIBRADO DE DIFENACOUM EN MATRIZ.....	24
FIGURA 21. CALIBRADO DE BRODIFACOUM EN MATRIZ.....	24
FIGURA 22. ESTABILIDAD DE COLOROFACINONA, BROMADIOLONA, DIFENACOUM Y BRODIFACOUM ADICIONADAS A UN SUELO EN ALTA CONCENTRACIÓN	26
FIGURA 23. ESTABILIDAD DE CLOROFACINONA A 30°C	27
FIGURA 24. ESTABILIDAD DE BROMADIOLONA A 30°C.....	27
FIGURA 25. ESTABILIDAD DE DIFENACOUM A 30°C.....	28
FIGURA 26. ESTABILIDAD DE BRODIFACOUM A 30°C	28
FIGURA 27. CROMATOGRAMAS DE LA MUESTRA CONSERVADA A 30°C DE LA TOMA 1 (AZUL) Y 7 (ROJO), OBTENIDOS CON DETECTOR (A) DAD Y (B) FLD	29