

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA****MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN
DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFÍA
DE GASES MASAS (GC-MS/MS) EN MUESTRAS
DE ORIGEN VEGETAL****Autor: JORGE SIMÓ PEIRÓ****Tutor: ANTONIO ZAPARDIEL PALENZUELA****FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
SEPTIEMBRE 2018**

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	iii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de los pesticidas	1
1.2. Residuos de plaguicidas	5
1.3. Control de residuos de plaguicidas. Normativa.	10
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	12
3. PARTE TÉORICA: Muestreo y métodos de extracción empleados en la determinación de residuos	13
3.1. Muestreo y homogeneización	13
3.2. Métodos de extracción empleados en la determinación de residuos	15
3.2.1. Extracción con disolventes orgánicos	15
3.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)	17
3.2.3. Extracción de dispersión en matriz en fase sólida (MSPD)	19
3.3. Métodos de separación, identificación y cuantificación de pesticidas	20
3.3.1. Cromatografía de gases	20
3.3.2. Cromatografía de líquidos	24
4. PARTE EXPERIMENTAL: MÉTODOS Y MATERIAL	26
4.1 Método de LUKE	26
4.2 Método de MILLS	28
4.3 Método 2,4- D y Dichlorprop (2,4- DP)	31
4.4 Método del Acetato de Etilo	33
4.5 Método N- Metilcarbamatatos	33

4.6 Método de QuEChERS	34
4.6.1 Aplicaciones del método QuEChERS	38
4.6.2 Trabajo seleccionado de determinación de 121 residuos de pesticidas en frutas y vegetales por GC-MS/MS empleando el método de QuEChERS	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Desarrollo del método de GC-MS/MS	47
5.2 Estimación de los límites de cuantificación	49
5.3 Rendimiento analítico	50
5.4 Validación del método	51
6. CONCLUSIONES	55
7. BIBLIOGRAFÍA	57

ANEXOS.

Anexo 1. Parámetros de espectrometría de masas para la determinación de pesticidas seleccionados por GC-MS/MS	a
Anexo 2: Parámetros de calibración para la matriz de tomate	c
Anexo 3: Incertidumbre estimada expandida para la matriz de tomate	d
Anexo 4. Precisión y exactitud. Ensayos de recuperación (matriz de tomate)	e
Anexo 5. Aplicación del método QuEChERS validado	f
Anexo 6. Campos de aplicación del método QuEChERS	h

RESUMEN

En este trabajo se presenta a la técnica de cromatografía de gases masas (GC-MS/MS) de triple cuadrupolo (QqQ) como una de las técnicas más empleadas, para abordar el análisis de residuos de plaguicidas en muestras de origen vegetal, por su elevada sensibilidad y fiabilidad. El empleo del monitoreo de reacción múltiple (MRM) nos permite proporcionar análisis cuantitativos y cualitativos de trazas de analitos en matrices de gran complejidad (pigmentos, grasas, etc.). A ello, hay que sumarle una técnica de extracción de alto valor por su facilidad, rapidez, bajo coste y su gran versatilidad, como es la metodología QuEChERS. Esta técnica de extracción junto con la GC-MS/MS nos permitirá, de modo sencillo y respetuoso con el medio ambiente, comparado con los métodos laboriosos convencionales, obtener unos magníficos valores de recuperación, dentro del rango 70 %- 120 %, con un %RSD \leq 20%, para un gran número de pesticidas y matrices. Con el método optimizado se obtienen límites de detección (LDD) entre 0.3 -5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, cumpliendo con los requisitos legales de los LMR establecidos para cada una de estas materias activas.

Esta metodología debería estar incorporada en el trabajo de rutina de los diferentes laboratorios de control, gracias a su versatilidad. Son muchos los estudios en los que se han introducido cambios en su versión original (Anastassiades M. et al., 2003), pudiendo ser validada para una gran cantidad de plaguicidas y matrices, siendo ello una garantía de la calidad de los resultados.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

FAO Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

OMS Organización Mundial de la Salud

LMR Límite máximo de residuo

LDD Límite de detección

LDC Límite de cuantificación

QuEChERS Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro

GC Cromatografía de gases

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

ppm Partes por millón (mg/kg)

ppb Partes por billón (µg/kg)

DL 50 Dosis letal 50

L.O.M Libro Oficial de Movimientos

P.S Plazo de seguridad

VR50 Vida residual media

BPA Buenas Prácticas Agrícolas

NOAEL Nivel sin efecto

IDA Ingestión diaria admisible

ARfD Dosis de referencia aguda

ATRIAS Tratamiento Integrado en Agricultura

RSD Desviación estándar relativa

ENAC Entidad Nacional de Acreditación

APIS Agrupaciones de Producción Integrada

EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

SPE Extracción en fase sólida

MSPD Dispersión de matriz en fase sólida

NPD Detectores termoiónicos o de nitrógeno-fósforo

ECD Detectores de captura electrónica

FPD Detectores fotométricos de llama

MS Espectrometría de masas

MS/MS Espectrometría de masa/masa o en cascada

EI Impacto electrónico

NCI Ionización química negativa

PCI Ionización química positiva

FLD Detector fluorimétrico

AOAC Asociación Oficial de Químicos Analistas

TPP Patrón interno de trifenilfosfato

MCR Materiales Certificados de Referencia

ISTD Método de Adiciones Estándar o Calibración Interna.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución principales grupos de sustancias químicas comercializados en España	1
Tabla 2. Clases toxicológicas de productos plaguicidas según la DL50 y formulación.....	2
Tabla 3. Propiedades de disolventes empleados comúnmente a 20-25°C	16
Tabla 4. Características generales detectores de GC empleados.....	22
Tabla 5. Material y reactivos empleados para el Método de Luke.....	27
Tabla 6. Material y reactivos empleados para el procedimiento de análisis de aceites y aceitunas.	31
Tabla 7. Material y reactivos empleados para el método 2,4-D y Dichlorprop (2,4-DP)	32
Tabla 8. Material y reactivos empleados para el método QuEChERS	36
Tabla 9. Estándares y reactivos empleados para el método QuEChERS	41
Tabla 10. Instrumentación y software utilizados en el análisis	42
Tabla 11. Preparación puntos de calibración	44
Tabla 12. Requisitos y criterios de validación	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución principales grupos de sustancias químicas comercializados en España.....	1
Figura 2. Principales insecticidas, plagas que combaten y su modo de acción.....	3
Figura 3. Principales herbicidas, rodenticidas y fungicidas, plagas que combaten y su modo de acción	4
Figura 4. Variación del contenido de Diazinón en lechugas. A) Peso medio de las lechugas; B) Curva de eliminación aparente por crecimiento; C) Curva de eliminación real por análisis	6
Figura 5. Curva de disipación de residuos de plaguicidas	7
Figura 6. Curva teórica de eliminación de plaguicidas en tratamientos de partes aéreas. A) Eliminación rápida debida a acciones mecánicas; B) Eliminación más lenta por causas físicas; C) Bloqueo del plaguicida en el vegetal.....	7
Figura 7. Cálculo del LMR	8
Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de preparación de las muestras para análisis de residuos	13
Figura 9. Etapas extracción en fase sólida	18
Figura 10. Etapas extracción de dispersión de matriz en fase sólida	19
Figura 11. Descripción del funcionamiento de un sistema MS/MS.....	22
Figura 12. Tipos de analizadores. A) Trampa de iones. B) Triple cuadrupolo (QqQ)	23
Figura 13. Multiresiduos según método de LUKE.....	26
Figura 14. Multiresiduos según método de MILLS.....	28
Figura 15. Multiresiduos aplicado a aceites y aceitunas.....	29
Figura 16. Vac- Elut y parte del material empleado.....	30
Figura 17. Extracción de 2,4- D y Dichlorprop (2,4- DP).....	32
Figura 18. Método Acetato de Etilo	33

Figura 19. Extracción de N-Metilcarbamatos (carbaril)	34
Figura 20. Extracción método QuEChERS primitivo	35
Figura 21. Extracción método QuEChERS modificado.....	37
Figura 22. Cromatograma (TIC) GC-MS tras Clean-up con PSA y PSA+C18+GCB	38
Figura 23. Cromatograma GC-MS de blanco de espinacas obtenido con el QuEChERS modificado y con métodos de GK filtración	39
Figura 24. Resultados de 3 métodos de extracción evaluados por GC-MS (nivel 0.2 mg/kg). % réplicas por cada método	40
Figura 25. Cromatograma GC-MS full Scan para un blanco de alcachofa para 3 métodos de extracción	40
Figura 26. Programa de temperaturas del horno para el cromatógrafo de gases	45
Figura 27. Ejemplo del efecto de energía de colisión para el Quinalfos. A) Transición 146.0-118.0 B) Transición 146.0-91.0.....	47
Figura 28. Cromatograma de una muestra de tomate contaminada. A) Modo SCAN B) Modo SRM.....	48
Figura 29. Calibración interna empleando el método de adiciones estándar.....	52
Figura 30. Ejemplo de un espectro de masas para el Quinalfos. A) Modo SCAN B) Modo MS/MS	54

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Generalidades de los pesticidas.

El principal enemigo de la agricultura, han sido desde muy antiguo las plagas. Según la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) las pérdidas de cosechas debidas a plagas y enfermedades a nivel mundial es del orden de 25-35% de las mismas (Coscollá, R., Coscollá. C., 2006). El problema se suavizó gracias a los avances en el campo de la química, mediante la introducción de los primeros formulados de plaguicidas a mediados del siglo XIX. En 1939 se descubrió el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), que marcó un antes y un después en el control de plagas, constituyendo el inicio del desarrollo de plaguicidas químicos. La evolución de su comercialización ha ido en constante crecimiento, siendo para el periodo 2011-2016 la siguiente (Figura 1 y Tabla 1).

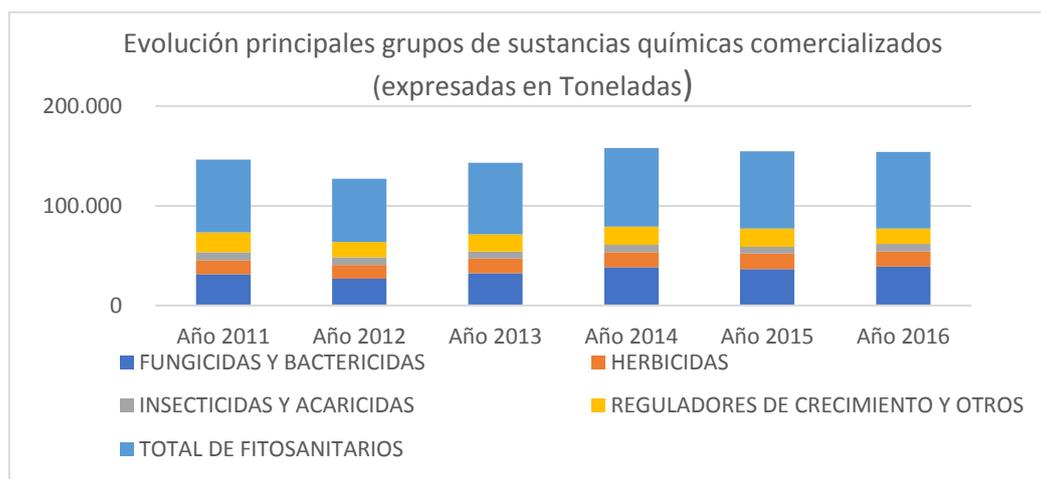


Figura 1. Evolución principales grupos de sustancias químicas comercializados en España

(Datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).

Tabla 1. Evolución principales grupos de sustancias químicas comercializados en España (expresadas en Toneladas)

(Datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).

GRUPOS PRINCIPALES	Año 2011	Año 2012	Año 2013	Año 2014	Año 2015	Año 2016
Fungicidas y bactericidas	31.345	26.798	32.400	38.393	36.437	38.919
Herbicidas	13.835	13.985	14.719	14.909	15.586	15.225
Insecticidas y acaricidas	8.146	7.704	6.909	7.609	6.758	7.599
Reguladores de crecimiento	19.852	15.072	17.519	18.015	18.517	15.309
Total fitosanitarios	73.178	63.559	71.547	78.926	77.298	77.052

Según el Real Decreto 3349/83, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, estos se definen como sustancias o ingredientes activos, así como los preparados o formulaciones que contengan una o varias de estas sustancias, destinadas a cualquiera de los fines siguientes:

- Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales, y prevenir su acción.
- Favorecer la producción vegetal, con excepción de nutrientes y los productos destinados a la enmienda de los suelos.
- Conservar los productos vegetales, incluida la protección de la madera.
- Destruir los vegetales perjudiciales o prevenir su desarrollo.
- Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales.

Entre las principales características de los plaguicidas encontramos su composición y formulación, la presentación, la toxicidad y el residuo del plaguicida. La toxicidad de un producto fitosanitario hace referencia a la peligrosidad para la salud de las personas y los animales. El empleo de plaguicidas implica riesgos toxicológicos para la agricultura (fitotoxicidad, bio-resistencia, etc.), el medio ambiente (riesgos para la fauna, el suelo y el agua) y para la salud (de forma directa en los agricultores o indirecta en el caso de los consumidores). Esta característica viene detallada en el envase. En la Tabla 2, tenemos las distintas clases toxicológicas de los productos plaguicidas según la OMS.

Tabla 2. Clases toxicológicas de productos plaguicidas según la DL50 (mg/kg p.v.) y formulación (Strada, 2014)

Clasificación de la OMS según riesgo	Formulación líquida		Formulación sólida	
	DL 50 aguda		DL 50 aguda	
	Oral	Dermal	Oral	Dermal
Clase Ia Producto sumamente peligroso	<20	<40	<5	<10
Clase Ib Producto muy peligroso	20-200	40-400	5-50	10-100
Clase II Producto moderadamente peligroso	200-2000	400-4000	50-500	100-1000
Clase III Producto poco peligroso	2000	>4000	500-2000	>1000
Clase IV Producto que normalmente no ofrece peligro	>3000		>2000	

Mediante pruebas o ensayos de laboratorio se determina la cantidad mínima de un determinado producto, expresada en miligramos por kilogramo de peso, necesaria para producir la muerte del 50% de los animales (ratas, cobayas, perros, etc.) en el estudio (Barberá, C., 1989). Esta cantidad se denomina Dosis Letal 50 o DL 50, y es lo que puede considerarse la unidad de toxicidad. Cuanto menor es el LD 50 mayor es la toxicidad del producto. Los comerciantes de productos tóxicos han de registrar sus ventas en el Libro Oficial de Movimientos [L.O.M].

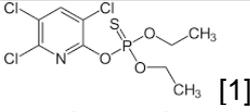
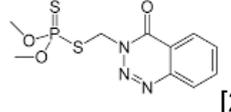
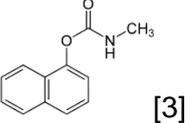
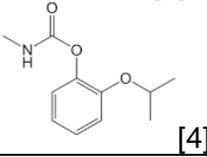
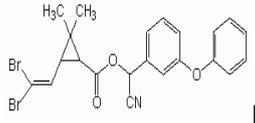
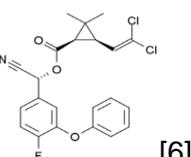
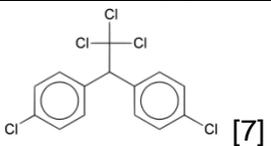
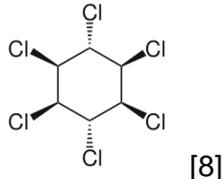
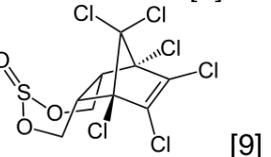
Nombre genérico	Clase	Plaga/ Modo de acción	Ejemplos	Fórmulas
Insecticidas	Organofosforados	Insectos voladores, saltadores y caminadores. Alteración de la excitabilidad del sistema nervioso.	Clorpirifos [1]	 [1]
			Metil-azinfos [2]	 [2]
	Carbamatos		Carbaril [3]	 [3]
			Propoxur [4]	 [4]
	Piretroides		Deltametrina [5]	 [5]
			β -Ciflutrina [6]	 [6]
	Organoclorados		DDT [7]	 [7]
			Lindano [8]	 [8]
			Endosulfán [9]	 [9]

Figura 2. Principales insecticidas, plagas que combaten y su modo de acción.

Los plaguicidas pueden clasificarse según el agente sobre el que actúan en insecticidas (lucha contra insectos), fungicidas (control de hongos), herbicidas (atacar las malezas), acaricidas (control de ácaros o arañas), nematocidas, bactericidas o antibióticos en el control de bacterias, moluscocidas o helicidas y rodenticidas (Cavallo, 2006; Novo et al., 2011).

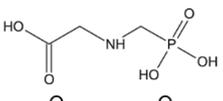
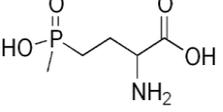
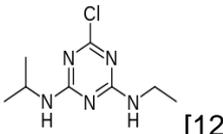
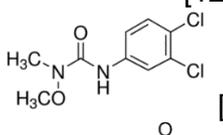
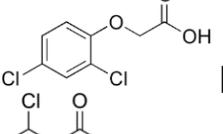
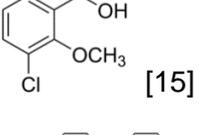
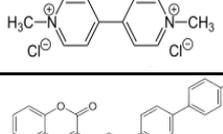
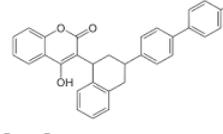
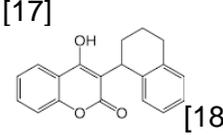
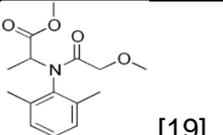
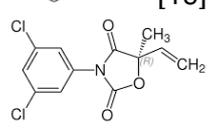
Nombre genérico	Clase	Plaga/ Modo de acción	Ejemplos	Fórmulas
Herbicidas	Inhibidores de la síntesis de biomoléculas Otras clases	Malezas. Inhiben la síntesis de aminoácidos esenciales para la vida vegetal Interfieren otros procesos críticos para el desarrollo completo de la planta-maleza	Glifosato [10]	 [10]
			Glufosinato [11]	 [11]
			Atrazina [12]	 [12]
			Linuron [13]	 [13]
			2,4-D [14]	 [14]
			Dicamba [15]	 [15]
Paraquat [16]			 [16]	
Rodenticidas	Cumarínicos Indanedionas	Ratas, ratones y otros roedores silvestres.	Brodifacum [17]	 [17]
		Inhiben la síntesis hepática de factores de coagulación sanguínea	Cumatetralilo [18]	 [18]
Fungicidas	Imidazoles Dicarboximidas Pirimidinas Piperazinas Triazoles Carbamatos Amidas de arilo	Desorganización de estructuras o funciones celulares esenciales para la supervivencia	Metalaxilo [19]	 [19]
			Vinclozolina [20]	 [20]

Figura 3. Principales herbicidas, rodenticidas y fungicidas, plagas que combaten y su modo de acción.

En las Figuras 2 y 3, vienen los principales grupos químicos de los plaguicidas, junto con la plaga a la que combaten y su modo de acción. Además de estos grupos, dentro de los insecticidas estarían los insecticidas naturales (nicotina, rotenona o las piretrinas naturales), los aceites minerales obtenidos a partir de derivados del petróleo u otros, los compuestos de origen mineral entre los que destacan los arsenicales (han desplazado a los organoclorados y organofosforados), los inhibidores de la quitina que actúan impidiendo la formación de quitina, inhibiendo el crecimiento natural de los insectos.

1.2. Residuos de plaguicidas.

Se entiende por residuo de plaguicida cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, tales como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción, y las impurezas consideradas de importancia toxicológica (Manual de Procedimientos del Codex 19^a. ed. 2010). Así pues, los residuos de plaguicidas son uno de los efectos nocivos que más preocupan en la actualidad, ya que pueden ser una amenaza para la salud pública.

Los productores y recolectores de los productos vegetales han de tener en consideración los plazos de seguridad (PS) de las distintas materias activas (representa el tiempo expresado en días, que debe transcurrir entre la última aplicación del plaguicida y la recolección del producto vegetal), la dosificación del producto la cual está directamente relacionada con el depósito de los productos fitosanitarios (expresada en miligramos de plaguicida por kilo de producto (mg/Kg)), el tiempo de vida residual media (VR50) (el tiempo, expresado en días, que tarda un residuo en llegar a un valor correspondiente al 50% del depósito inicial), la persistencia del producto (tiempo para que el plaguicida pierda, al menos, el 95% de su actividad bajo condiciones ambientales y dosis de aplicaciones normales).

La persistencia de un plaguicida determinará su poder contaminante, siendo mayor a mayor persistencia, y en una planta dependerá de la acción de diversos factores, como son el crecimiento vegetal, causas mecánicas y físicas y la degradación química, que van a influir en la disminución progresiva de los residuos.

El crecimiento vegetal se basa en que el aumento de peso de la planta hace que disminuya proporcionalmente la cantidad de residuos, que vienen expresados como miligramos de

plaguicida por kilogramo de vegetal (ppm). Entre las causas mecánicas y físicas están principalmente la lluvia y el viento, especialmente si ocurren poco después de una aplicación. En cuanto a las causas físicas se consideran la volatilización que dependerá de cada materia activa y de las condiciones de temperatura, viento, etc. y otra la solubilización que se trataría de la disolución del plaguicida por el efecto de la lluvia, aunque estos productos suelen caracterizarse por solubilidades bajas. La degradación química consiste en la transformación de unas sustancias en otras, siendo dependiente de la estructura química del producto. Esta degradación se podrá producir por medio de reacciones simples o bien en reacciones bioquímicas más complejas que se podrán dar tanto en la superficie del vegetal como en el interior de los tejidos. En la Figura 4 observamos la variación del contenido de Diazinón en lechugas, atendiendo a los 3 factores que pueden influir en la persistencia de un plaguicida.

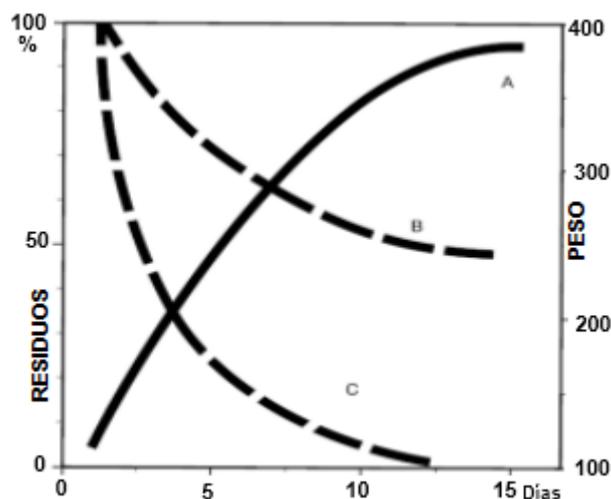


Figura 4. Variación del contenido de Diazinón en lechugas (Viel, 1972; citado por Coscollá, 1993). Ref: A) Peso medio de las lechugas; B) Curva de eliminación aparente por crecimiento. C) Curva de eliminación real por análisis.

Si hacemos un estudio, en breves intervalos de tiempo de la evolución de las cantidades de residuos presentes sobre un vegetal tratado obtenemos las llamadas curvas de degradación, eliminación o disipación, las cuales son específicas para cada materia activa y vegetal (Figura 5). El conocimiento de estas nos permite efectuar predicciones sobre el contenido de residuos como consecuencia de un tratamiento dado, conocer la importancia de las distintas variables en el proceso y la posibilidad de modificarlas para influir sobre el mismo.

El proceso de disipación sigue, en general, una cinética de primer orden, aunque en algunos casos se consideran tres o más dinámicas consecutivas. En la primera fase, llamada "fase de

desprendimiento”, la eliminación es muy rápida y se debe a las acciones mecánicas del viento y la lluvia; esta etapa es seguida de una más lenta en la que los fenómenos físicos y/o químicos están involucrados y se la llama “fase de degradación”. La tercera y última etapa, la “fase de persistencia”, es sumamente lenta y está determinada por el bloqueo del plaguicida en el vegetal (Figura 6).

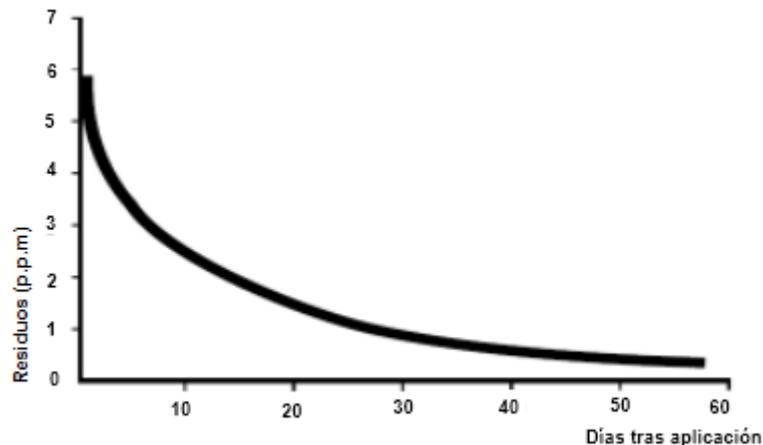


Figura 5. Curva de disipación de residuos de plaguicidas (Coscollá, R, 1993)

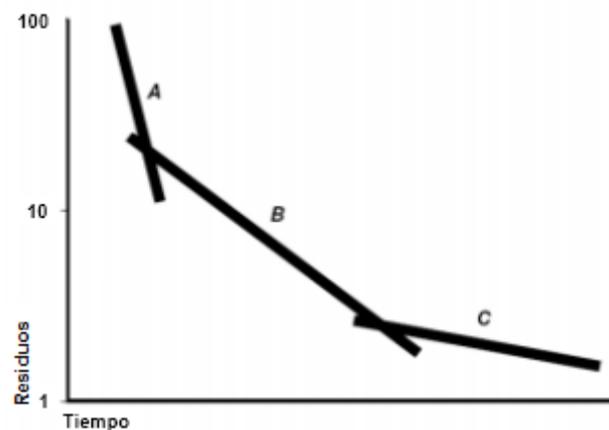


Figura 6. Curva de teórica de eliminación de plaguicidas en tratamientos de partes aéreas (Ascoet y Missonnier, 1974; Citados por Coscollá, 1993). Ref: A- Eliminación rápida debida a acciones mecánicas; B- Eliminación más lenta por causas físicas; C-Bloqueo del plaguicida en el vegetal.

Resultado de la presencia de residuos y de la gran sensibilización, las autoridades se han visto obligadas a legislar. Es imprescindible estar permanentemente informado de las modificaciones en la legislación internacional, lo que permitirá evitar problemas derivados de la presencia de sustancias prohibidas o con un residuo superior al límite máximo de residuo permitido.

El Límite Máximo de Residuo (L.M.R) o de tolerancia, se define como la cantidad máxima de residuo de un producto fitosanitario específico recomendado por la Comisión del Codex Alimentarius legalmente permitido en o sobre los productos alimenticios y piensos para animales. Se expresa en partes por millón (ppm). Los LMR se basan en datos de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y los alimentos derivados de productos que cumplen con los respectivos LMR están destinados a ser toxicológicamente aceptables. (Manual de Procedimientos del Codex 19^a. ed. 2010)

El empleo de plaguicidas se autoriza con el previo establecimiento de su LMR o tolerancias en los productos vegetales o alimentos tratados, y de acuerdo con esos valores se fijan los Plazos de Seguridad definidos con anterioridad, aunque esto no implique la autorización de dicho producto. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), es la encargada de pronunciarse para cada LMR y cada modificación, y la Comisión elabora conforme al dictamen de la EFSA un reglamento que establece un nuevo LMR o lo modifica. El LMR se establece siguiendo diversos criterios (Figura 7):

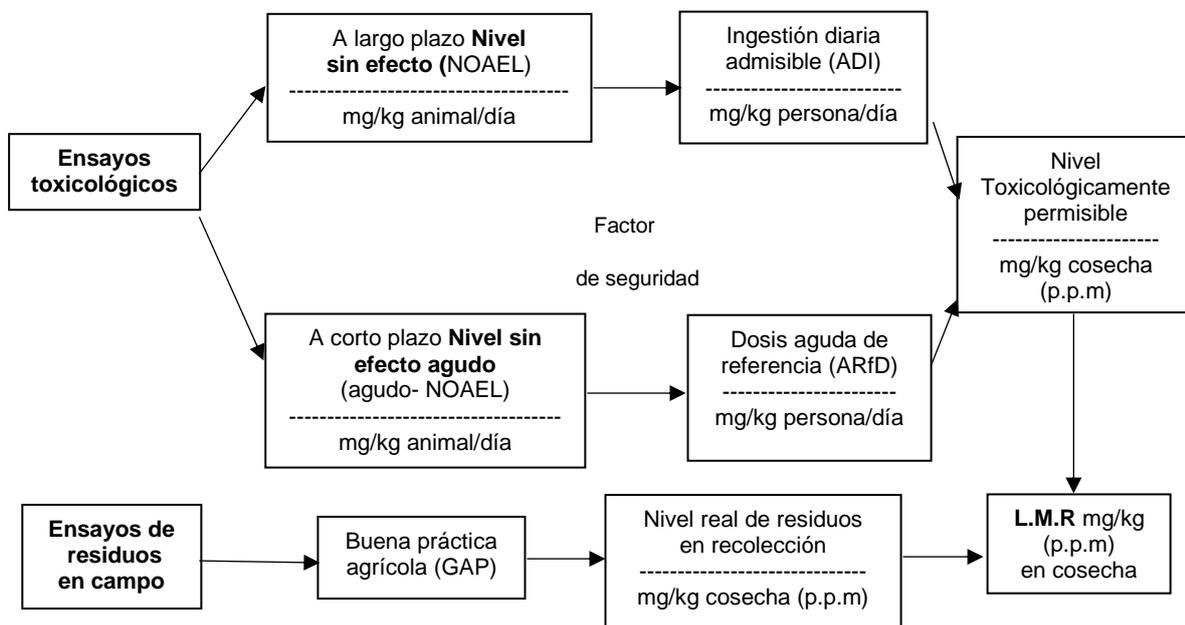


Figura 7. Cálculo del LMR (Coscollá, R., 2006).

* Criterio toxicológico: hace referencia a la posible ingesta diaria de residuos, que deberá ser aquella que con total seguridad no provoque ningún efecto nocivo en las personas. Este se establece a partir de las consideraciones siguientes:

- Nivel sin efecto (NOAEL): dosis más elevada de un determinado plaguicida que ingerida diariamente por animales de experimentación, durante al menos dos años, no les produce efectos nocivos. Expresado en: (mg/Kg animal/día).

- Ingestión diaria admisible (IDA): según la FAO/OMS, es la cantidad de plaguicida que, ingerida diariamente por el hombre durante toda su vida, no muestra riesgos apreciables según los conocimientos médicos y sanitarios actuales. Se obtiene a partir del NOAEL, aplicándole un coeficiente de seguridad (~100). Expresado en: (mg/Kg persona/día).

- Dosis de referencia aguda (ARfD en inglés), “Acute Reference Dose” representa la cantidad de sustancia, expresada en miligramos por kilogramo de peso vivo, que puede ser ingerida durante un corto período de tiempo, normalmente en una comida o día, sin riesgo apreciable para la salud, basándose en los conocimientos disponibles cuando se efectúa el cálculo y teniendo en cuenta los grupos más vulnerables para la población (niños y fetos). Su cálculo se efectúa a partir de NOAEL dividiéndola por un factor de seguridad (~100), de forma similar a como se calcula la IDA a partir del NOAEL estimado para el riesgo crónico. Expresada en: (mg/Kg peso corporal).

- El nivel permisible se calcula:

$$\text{Nivel permisible} = ((\text{IDA} * \text{Peso cuerpo humano}) / \text{factor alimentario}),$$

donde se estima un peso del cuerpo humano de 60 kg y un factor alimentario que representa el consumo diario por “cápita” del alimento o clase de alimento que puede contener los residuos del plaguicida en cuestión.

*Criterio agronómico: cantidad mínima de plaguicida necesaria para el control de una plaga, lo cual incluye el cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el uso de plaguicidas. Se entiende por BPA en el uso de plaguicidas, todo uso inocuo autorizado a nivel nacional, en las condiciones existentes, de los plaguicidas necesarios para un control eficaz y fiable de las plagas. Comprende una gama de niveles de aplicación de plaguicidas hasta la concentración de uso autorizado más elevada, de forma que quede la concentración mínima posible del residuo. (Manual de Procedimientos del Codex 19^a. ed. 2010).

1.3. Control de residuos de plaguicidas. Normativa.

Las autoridades responsables en materia de Salud Pública y agricultura no sólo legislan sobre los plaguicidas y fijan los diferentes LMR, sino que además se encargan de vigilar su cumplimiento. Cada vez son más las empresas agroalimentarias privadas o público- privadas preocupadas por esta temática, quienes realizan controles rutinarios de sus productos, en laboratorios propios o externos. No obstante, las Administraciones Públicas realizan sus planes oficiales de vigilancia y control de residuos de plaguicidas en alimentos por imperativo legal, siendo obligatorios desde 1990 en la Unión Europea con la entrada en vigor de la **Directiva 90/642/CEE** para el caso de frutas y hortalizas. La Administración Pública tiene en el ámbito del control de residuos tareas como el desarrollo de Agrupaciones de Tratamiento Integrado en Agricultura (ATRIAS), Agrupaciones de Producción Integrada (APIS), la ejecución del plan de vigilancia de la comercialización y el control de residuos.

En el Estado Español, es de aplicación la **Ley 43/2002**, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal, la cual tiene por objeto establecer la normativa básica y las normas de coordinación en materia de sanidad vegetal. Entre sus fines está:

- a) Proteger los vegetales y los productos vegetales de los daños ocasionados por las plagas.
- b) Proteger el territorio nacional y el de la Unión Europea, de acuerdo con la normativa fitosanitaria comunitaria, de la introducción de plagas de cuarentena para los vegetales y los productos vegetales u otros objetos, y evitar la propagación de las ya existentes.
- c) Proteger los animales, vegetales y microorganismos que anulen o limiten la actividad de los organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales.
- d) Prevenir los riesgos que para la salud de las personas y animales y contra el medio ambiente puedan derivarse del uso de los productos fitosanitarios.
- e) Garantizar que los medios de defensa fitosanitaria reúnan las debidas condiciones de utilidad, eficacia y seguridad.

Son de aplicación también algunas Directivas Europeas, Reglamento y Reales Decretos:

- Relativo a los métodos de muestreo, tenemos la **Directiva 2002/63/CE** por la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal.

- Relativos a la comercialización y uso, tenemos el **Reglamento (CE) N° 1107/2009** relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, la Directiva 2009/128/CE por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, el **Real Decreto 1311/2012** por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios.
- Relativo a las estadísticas de plaguicidas el **Reglamento (CE) N° 1185/2009**, el **Reglamento (UE) N° 656/2011** por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 1185/2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas, con respecto a las definiciones y la lista de sustancias activas, el **Reglamento (UE) N° 2017/269** que se modifica el Reglamento (CE) N° 1185/2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas, con respecto a la lista de sustancias activas.
- Relativo a los límites máximos de residuos permitidos en productos vegetales, disponemos del **Real Decreto 280/1994** de 18 de febrero, sobre límites máximos y control de residuos de plaguicidas en productos vegetales (B.O.E. núm: 58 de 9-3-94) y el **Reglamento (CE) N° 396/2005** relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, que deroga la Directiva 86/362/CEE, la Directiva 86/363/CEE y la Directiva 76/895/CEE, el cual reúne en un solo texto y armoniza los límites máximos de residuos aplicables a los diferentes productos destinados a la alimentación humana o animal en la Unión Europea (UE) en su composición, a fin de proteger la salud animal y humana, fijando un límite máximo de 0,01 mg/kg aplicable por defecto. Con anterioridad a estas 3 últimas Directivas derogadas cada país miembro aplicaba sus propios límites máximos de residuos de plaguicidas.

En el ámbito de trabajo del laboratorio de control, se deberá estar actualizado en todo momento de todos los cambios legislativos. Pueden consultarse a nivel nacional en el Boletín Oficial del Estado, en el link: <https://www.boe.es>, o bien a nivel Europeo en el link: <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html?locale=es>. En cuanto a los valores de los LMR se encuentran actualizados en la página de la Comisión Europea (EU Pesticides database - European Commission), en el enlace: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>, o en el link del Codex Alimentarius: <http://www.codexalimentarius.net>

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.

El control de residuos de plaguicidas está cada vez más presente, siendo de gran interés la búsqueda de metodologías que permitan la detección exacta e inequívoca de estos con el fin de hacer cumplir la legislación, garantizado con ello la salud pública.

En el presente trabajo se hace una recopilación de los métodos convencionales más frecuentes nombrados en la bibliografía, y especialmente se exponen las ventajas de la utilización de uno de los métodos más novedosos como es el QuEChERS acoplado a la técnica de GC-MS/MS. Para ello, se seleccionan algunos artículos de los últimos 8 años relacionados con esta metodología, viendo en profundidad cómo crear un buen método de identificación y cuantificación de los distintos grupos de pesticidas mediante el equipo de GC-MS/MS atendiendo a los tiempos de retención y los iones cualificadores y cuantificadores, como calcular los porcentajes de recuperación obtenidos, además de los límites de detección y cuantificación de cada pesticida y la validación del método de extracción y análisis. Para llevar a cabo este estudio se han consultado principalmente las bases de datos de Springer Link, Springer Science y Science Direct, utilizando las palabras claves QuEChERS, GC-MS/MS y Vegetables.

3. PARTE TEÓRICA: Muestreo y métodos de extracción empleados en la determinación de residuos.

A la hora de llevar a cabo la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de materia vegetal hay que considerar tres etapas que vienen bien descritas en el Figura 8.

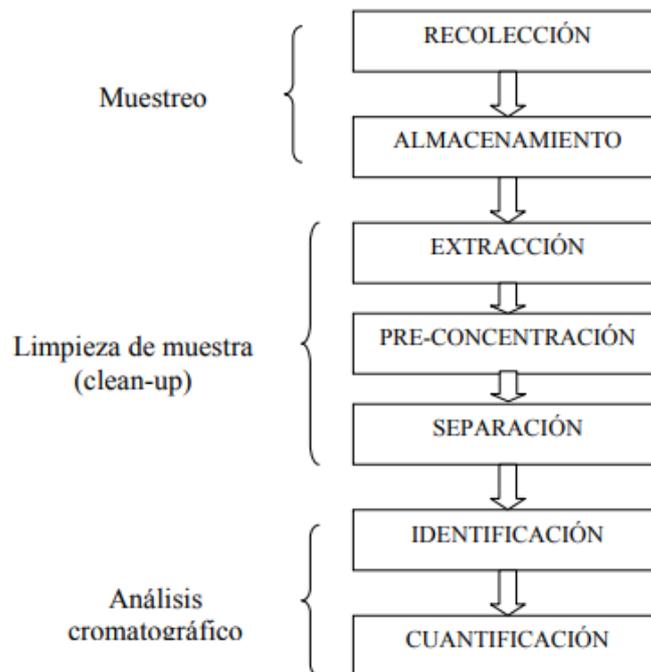


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de preparación de las muestras para análisis de residuos

(Sala K.P, et al.,1990. Extraído de Bouaid A., 2001)

3.1. Muestreo y homogeneización.

Los laboratorios dedicados al control de residuos deben tener establecido un buen procedimiento de toma y homogeneización de la muestra de modo que esta sea representativa, y puedan obtenerse unos resultados satisfactorios. Dada la importancia de este paso, existe una regulación al respecto. Las muestras de alimentos se tomarán de conformidad con la **Directiva 2002/63 / CE**, por la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal.

Deben tenerse en cuenta las siguientes consideraciones generales a la hora de realizar el muestreo (Tuija Pihlström, et al., 2017):

- En cuanto al transporte: las muestras deben transportarse en condiciones adecuadas y de limpieza, con un embalaje robusto. Los productos perecederos pueden tener que congelarse para evitar su deterioro. Debe ser lo suficientemente rápido, preferiblemente dentro de un día.
- En cuanto a la trazabilidad: las muestras deben identificarse de manera clara e indeleble, de forma que se garantice la trazabilidad.
- En cuanto al almacenamiento: las muestras que no se analicen inmediatamente deben almacenarse en condiciones que minimicen la descomposición y pérdida de pesticidas. Los productos frescos deben almacenarse en el refrigerador, no más de 5 días. Los productos secos pueden almacenarse a temperatura ambiente, salvo que se exceda de 2 semanas. Especial precaución para las muestras que puedan contener residuos de plaguicidas muy lábiles o volátiles, ya que deberían de realizarse sus análisis tan pronto como sea posible con el fin de reducir las pérdidas.

La homogenización de la muestra será diferente según el tipo de matriz. Para la gran mayoría de matrices de frutas y hortalizas se emplea un triturador convencional, que es similar a una olla cerrada con aspas afiladas en el centro. Para muestras como hojas, frutos secos, etc. es mejor introducirlas en molinillos capaces de reducir suficientemente el tamaño del grano. En el caso de aceitunas, se realizará en un molino de martillo.

Las partes del producto que deben ser analizados están estipulados en el Reglamento (CE) N° 396/2005 en su anexo 11. En muchas ocasiones y según la finalidad del análisis, deben eliminar partes de la muestra llegada al laboratorio, tales como: hojas, pulpa, ramas, etc. Para llevar a cabo la homogeneización de la muestra deben hacerse las siguientes observaciones (Tuija Pihlström, et al., 2017):

- Homogeneizar la muestra antes de que ocurra cualquier deterioro visible.
- Los procedimientos de procesamiento y almacenamiento de la muestra no deben demostrar efecto alguno sobre los residuos presentes en la muestra. En caso de existir la evidencia de que la trituración a temperatura ambiente tiene una influencia significativa en la degradación de ciertos residuos de plaguicidas, se recomienda que las muestras se homogenicen a baja temperatura.

- La porción de prueba debe consistir en unidades enteras del producto, o segmentos retirados de grandes unidades. Para todos los demás análisis, toda la muestra de laboratorio debe ser triturada. Para mejorar la eficiencia de extracción de productos básicos de baja humedad (por ejemplo, cereales, especias, etc.) se recomienda obtener tamaños de partícula pequeños (< 1 mm), empleando molinillos.

Una vez trituradas las muestras estas son debidamente etiquetadas, y son llevadas a la zona habilitada para realizar la extracción. Algunas muestras no requieren de la etapa de trituración.

3.2. Métodos de extracción empleados en la determinación de residuos.

Los métodos de extracción multiresiduos son muy empleados puesto que permiten extraer, con relativa facilidad, gran cantidad de pesticidas simultáneamente de un amplio rango de polaridades. El principal inconveniente de estos métodos es la presencia de componentes de la matriz (materia grasa, clorofilas, agua, azúcares, resinas naturales, etc.) junto con los analitos extraídos, que pueden generar interferencias (Uclés, S. et al., 2017). Estas interferencias pueden competir con los pesticidas en sitios clave como son en el puente de inyección o en la cabeza de la columna durante el análisis, dando lugar a resultados incorrectos, tal como recuperaciones usualmente >100% (Lin XY. et al., 2018). Estas interferencias afectan a los límites de detección. Para solucionar en parte este problema y así aumentar la selectividad y la sensibilidad, se han desarrollado diversos métodos extracción, concentración y purificación, aunque con ello se aumenta el tiempo y consumo de disolventes orgánicos (Wu CC., 2017).

3.2.1. Extracción con disolventes orgánicos.

Es la técnica más comúnmente empleada por su facilidad y amplitud. En función del estado (líquido o sólido) de las muestras variará su aplicación. Las muestras sólidas tras su homogeneizado se agitan con un disolvente orgánico o una mezcla de ellos. Inmediatamente después, se podrá tomar una alícuota de la fase orgánica para concentrarla, o bien se le añadirá a la fase orgánica una porción de NaCl o Na₂SO₄ para aumentar la fuerza iónica e incrementar la cantidad de analitos extraídos, separando mejor las fases (Fenik, J., et al., 2011). En el primer caso, tras concentrar la muestra se re-disuelve en una mezcla de

disolventes orgánicos aptos para inyectar en el sistema GC. En el segundo caso, la muestra se centrifuga para separar la fase orgánica, concentrar el sobrenadante e inyectar. El paso de concentración de la muestra es necesario para disminuir el volumen de disolvente y reducir con ello los límites de detección.

Son múltiples los disolventes orgánicos que pueden emplearse para llevar a cabo la extracción, siendo la polaridad el factor más importante a la hora de escoger el más adecuado. En la Tabla 3, tenemos una selección de los disolventes más empleados, junto con sus principales propiedades. Requeriremos de disolventes que eviten los compuestos polares al máximo, con el fin de conseguir una mayor selectividad. La acetona, el acetonitrilo y el acetato de etilo han mostrado proporcionar altas recuperaciones para amplios intervalos de pesticidas.

Tabla 3. Propiedades de disolventes empleados comúnmente a 20-25°C (Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003)

<i>Disolvente</i>	<i>Polaridad</i>	<i>Solubilidad en agua (%, p/p)</i>	<i>Densidad (g/mL)</i>	<i>Punto de ebullición (°C)</i>
Agua	10.2	-	0.998	100.0
Acetonitrilo	5.8	100	0.786	81.6
Acetona	5.1	100	0.791	56.2
Metanol	5.2	100	0.792	64.6
Etanol	5.2	100	0.789	78.4
Acetato de etilo	4.4	8.7	0.902	77.2
Diclorometano	3.1	1.6	1.33	40.7
Ciclohexano	0.2	0.006	0.789	80.7
Hexano	0.0	0.014	0.660	69.0

Tanto el punto de ebullición, la densidad como la solubilidad en agua son tres propiedades esenciales para saber si las etapas de concentración y separación pueden llevarse a cabo con garantías. Es esencial hacer coincidir la polaridad del disolvente con la solubilidad del analito (Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003).

El acetonitrilo es un disolvente, capaz de extraer un amplio rango de pesticidas con diferentes polaridades, con alta capacidad y selectividad comparándolo con disolventes como el acetato de etilo o la acetona. Su miscibilidad en agua le permite tener una buena penetración en la fase acuosa de las muestras vegetales (80-95% agua), lo cual permite una buena separación de la fase acuosa mediante la adición de sales, sin requerir de disolventes no polares. Así

mismo, presenta suficientes propiedades dispersivas (hidrofóbicas) para extraer eficientemente tanto a residuos de pesticidas polares como no polares desde alimentos no grasos. Estos extractos suelen contener co-extraídos (pigmentos generalmente), aunque menores en comparación con otros disolventes, con lo que se requerirá de una etapa posterior de limpieza (González, M.Á., et al 2015). Es el disolvente comúnmente empleado en el método QuEChERS.

Han sido descritos otros métodos basados en el empleo del acetato de etilo para diferentes grupos de pesticidas en frutas y vegetales (Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003), que además proporcionan unas magníficas recuperaciones para un espectro amplio de pesticidas con propiedades distintas. El acetato de etilo extrae con mayor facilidad compuestos apolares (Uclés, S., 2017). La ventaja de este disolvente es que es menos contaminante que los clorados, aunque puede co-extraer pequeñas porciones de compuestos de la matriz. Esta técnica suele emplearse en laboratorios de análisis de rutina para muestras de líquidos, muestras acuosas (frutas y vegetales), por su simplicidad, rapidez y por sus altas recuperaciones.

3.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida es una alternativa frente a la simple extracción por métodos clásicos con disolventes orgánicos en embudos de decantación, siendo más cómoda, barata y rápida. Este procedimiento se basa en el paso a través de una mini-columna de una cierta alícuota de muestra en forma líquida, resultante de la extracción y evaporación en una primera etapa, a través de un adsorbente sólido (sílice, carbón, alúmina, cambiador iónico, etc.). En un primer momento, el analito de interés será el que quede retenido en la columna junto con los posibles interferentes y, en una posterior etapa de lavado los interferentes serán eliminados quedando el analito retenido dada su mayor afinidad. El analito posteriormente será recogido pasando una disolución adecuada (eluyente). En la Figura 9, vemos el proceso de extracción en fase sólida de modo esquemático.

Este modo de extracción tiene la doble ventaja de aislar la especie a medir evitando de este modo posibles interferencias en la determinación, y de concentrarla, siendo el factor de enriquecimiento en algunos casos cercano a cien. Generalmente es más adecuado para compuestos hidrófobos o apolares que para sustancias iónicas. Este tipo de extracción es a

la vez que rápido, reproducible y, sobre todo, selectivo. La selectividad es la capacidad del adsorbente de discriminar entre los analitos y los restantes componentes de la matriz y vendrá en función de tres parámetros: la estructura química de los analitos, las propiedades del adsorbente y la composición de la matriz de la muestra.

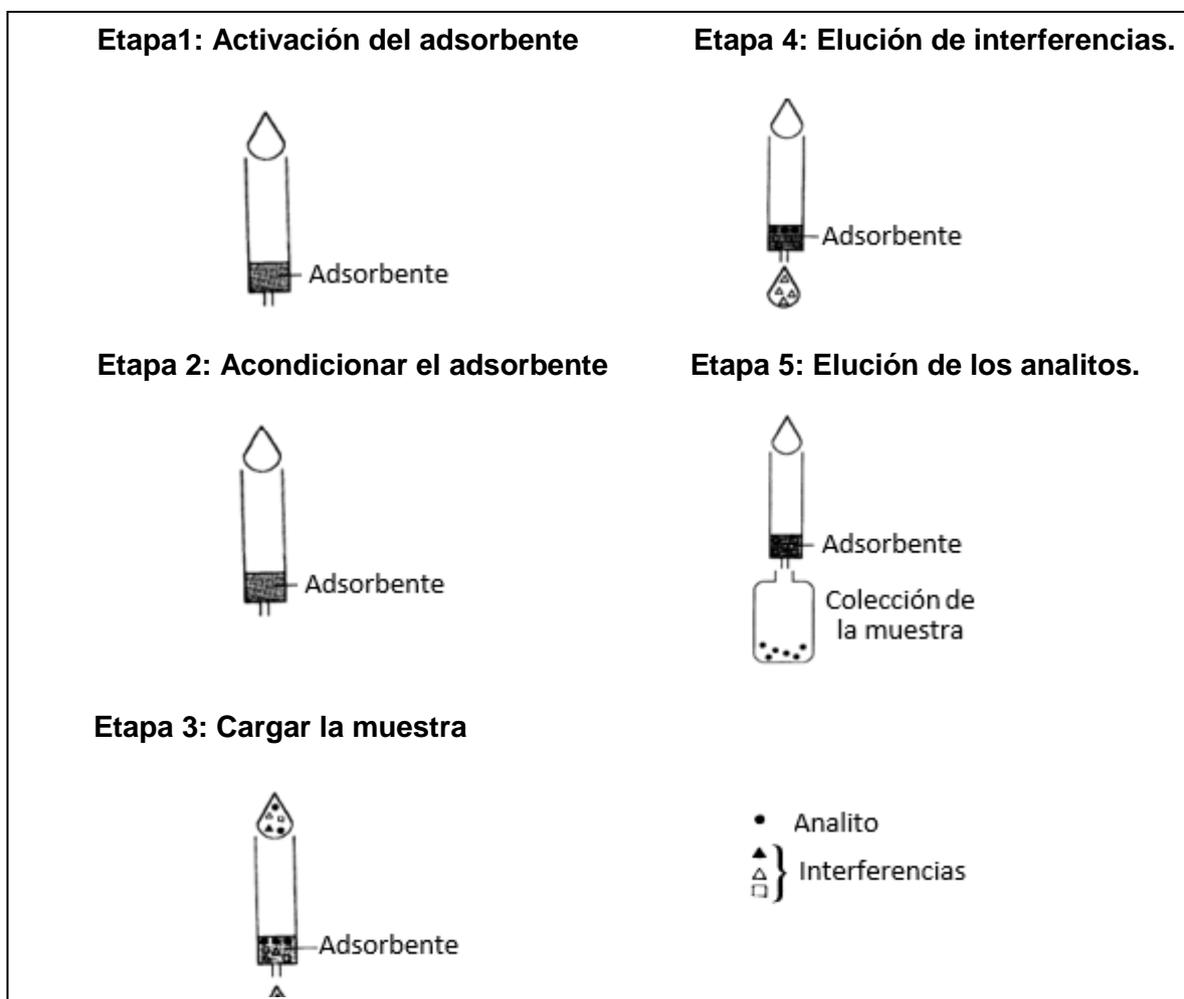


Figura 9. Etapas extracción en fase sólida (Moors M. et al., 1994, Extraído de Bouaid A., 2001)

Hoy día existen equipos para automatizar todo el proceso. De este modo, se consigue una menor pérdida de los analitos y se evitan posibles contaminaciones (Amelin V.G. et al., 2017). El modelo ASPEC XL, es uno de los empleados en el método convencional para la determinación de Benzimidazoles. Nos permitirá auto-programar todo el procedimiento para llevar a cabo una buena extracción en fase sólida (SPE). Las distintas etapas del proceso son: purga del sistema (limpieza y eliminación de burbujas), acondicionamiento de la columna, retención del analito y la elución de este. Si se requiere se neutraliza la muestra.

3.2.3. Extracción de dispersión en matriz en fase sólida (MSPD).

La dispersión en matriz en fase sólida (MSPD) fue introducida por Barker en 1989, ha tenido gran aplicación en aquellos procesos analíticos que requieren de una preparación, extracción y separación en muestras sólidas, semi-sólidas o altamente viscosas (Barker S., 2007). Aplicable al análisis de pesticidas en aceites vegetales (Li J. et al., 2014). Es todo un reto extraer los pesticidas lipofílicos que puedan contener estas muestras, como es el caso del Hexaclorobenceno, puesto que tienden a quedar retenidos en una fase lipídica (He Z. et al., 2017). Se caracteriza por su simplicidad y flexibilidad. El fundamento de esta extracción es idéntico a la SPE, pero con alguna peculiaridad. En la Figura 10, vemos gráficamente los pasos:

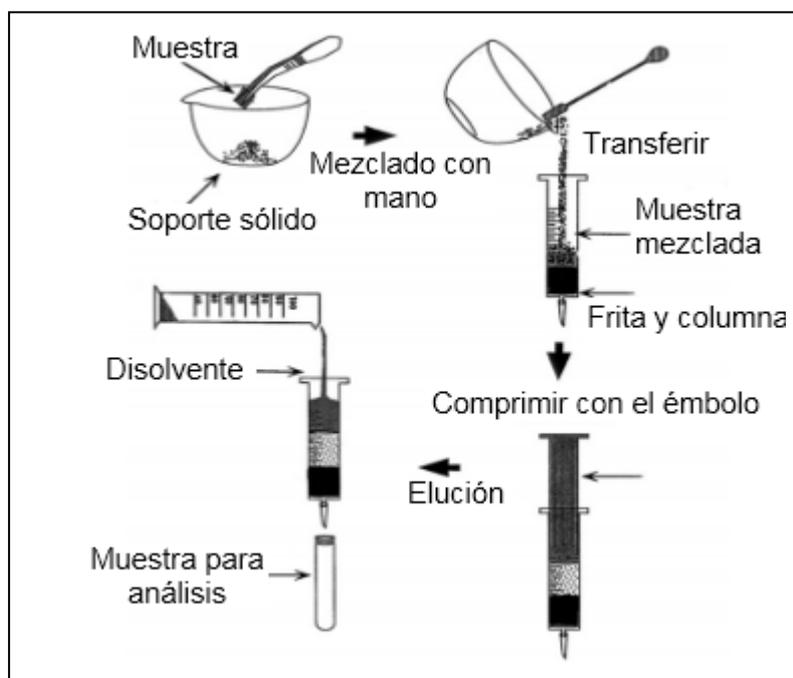


Figura 10. Etapas extracción de dispersión de matriz en fase sólida (Steven a. Barker, 2007)

En este caso las muestras se mezclan previamente en un mortero con un soporte sólido (C18, florisil, aminopropil, etc.) formando una fase perfectamente homogénea. Esta se vierte en el interior de la columna la cual puede contener florisil activado (aplicación de calor en estufa aprox. 130 °C, durante 24 h), de ahí el nombre de matriz dispersa en fase sólida. Tras haber introducido la muestra se hará pasar un eluyente (por ejemplo, el acetonitrilo) que arrastrará los analitos de interés, quedando retenidos los lípidos que pudiese contener la muestra. Las columnas pueden ser preparadas manualmente, empleando la fase adsorbente que se requiera en cada momento.

3.3. Métodos de separación, identificación y cuantificación de pesticidas.

En los laboratorios de análisis de residuos de plaguicidas, casi la totalidad de sus analitos son compuestos orgánicos (Organoclorados, Organofosforados, Piretroides, Nitrogenados, Azufrados, etc.) luego, entre las mejores técnicas para la separación, identificación y cuantificación se encuentran la cromatografía de gases y de líquidos acopladas a distintos detectores (ECD, NPD, MS, etc.).

3.3.1. Cromatografía de gases.

El empleo de la cromatografía de gases para el análisis de multiresiduos ha sido una constante desde que en 1951 la revista *Journal of biochemistry* publicara el primer trabajo sobre cromatografía de reparto gas-líquido. Las mejoras continuas en el diseño de las columnas y los avances en el desarrollo instrumental han convertido a esta técnica en la más utilizada para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas de compuestos orgánicos de volatilidad media y alta (Bouaid A., 2001).

Desde el punto de vista funcional un equipo de CG está compuesto de tres módulos fundamentales: un inyector, una columna y un detector, reunidos en una única instalación. La fase móvil que arrastra la muestra a través de la columna es el gas portador cuyos caudales deben ser controlados con gran precisión permitiendo una gran repetibilidad de los tiempos de retención. El análisis comienza en el momento en que se introduce una pequeña cantidad de muestra en forma líquida o gaseosa en el puerto de inyección, que tiene la doble función de transformar a estado vapor y de introducirlo en el seno de la corriente gaseosa en el principio de la columna. La cantidad de muestra que llegue a la cabeza de la columna capilar debe controlarse mediante el adecuado modo split/splitless de inyección. La columna capilar se presenta como un tubo de sección delgada, enrollado sobre sí mismo en espiral, de uno o más de cien metros de longitud según los casos, y que contiene la fase estacionaria. Entre las columnas más frecuentes en el análisis de pesticidas está la HP-5MS (Agilent-HP 5 MS, 3000 mm x 0.25 mm, 0.25 μ m) (Wu, CC, 2017). La columna está situada en un recinto a temperatura controlada (horno). La fase gaseosa a la salida de la columna pasa por el detector antes de salir al aire libre. En GC existen cuatro factores operacionales para una fase estacionaria dada: la longitud de la columna, la velocidad de la fase móvil (gas portador), la relación de fases y la temperatura de la columna (programa de temperaturas). La

cromatografía de gases suele estar acoplada a diferentes detectores específicos, sobre los cuales ahora hablaremos. Sus principales características están en la Tabla 4.

- Los detectores termoiónicos (NPD) o de nitrógeno-fósforo son muy sensibles a los compuestos nitrogenados o fosforados, y vienen estando en uso desde 1970. Incluyen un pequeño cilindro de cerámica, dopado de una sal alcalina al que se le aplica una tensión eléctrica para mantener un pequeño plasma (800°C) alimentado por una mezcla de aire/ hidrógeno. La cerámica alcalina debe cambiarse periódicamente.
- Los detectores de captura electrónica (ECD) son altamente selectivos de derivados halogenados de compuestos orgánicos (DDT, Dieldrín y Endrín) desde hace 50 años. Una corriente de nitrógeno ionizada por un haz de electrones generados por medio de una fuente radiactiva β - de energía débil, circula entre dos electrodos sometidos a una diferencia de potencial de una centena de voltios, de manera que en reposo se establece una corriente básica de I_0 debida esencialmente a los electrones libres, muy móviles. Si las moléculas que contienen halógeno atraviesan la zona entre los dos electrodos, captan parte de los electrones para formar iones mucho más pesados y, por tanto, menos móviles. Uno de los inconvenientes del detector de captura de electrones es su baja selectividad debido a que en la matriz existen un gran número de compuestos de carácter electrofílico, proporcionando señales no específicas, siendo difícil identificar al compuesto que ha generado esa señal. Este detector solo ha resuelto la detección selectiva y sensible de pesticidas halogenados (DDT, Hexaclorociclohexano), pero los pesticidas sin halógenos tales como los organofosforadas carecían de detectores sensibles en GC.
- El detector fotométrico de llama (FPD) es sensible a los compuestos azufrados o fosforados, que viene estando en uso desde 1970, y tiene grandes aplicaciones en el ámbito del análisis alimentario, puesto que su selectividad ahorra mucho trabajo en la preparación de muestras. El principio de su funcionamiento reside en la capacidad de producir especies quimio-luminiscentes en la llama, los hidrocarburos que contienen P y S. Estas especies emiten luz a una determinada longitud de onda característica de las especies en la muestra, que pueden aislarse fácilmente con un filtro óptico o interferencia, de modo que la luz emitida se registra en un fotomultiplicador.

- El detector selectivo de masas mide la masa de los iones y su abundancia. La simple combinación GC-MS es una de las herramientas más poderosas del químico analítico y se caracteriza por su gran capacidad de identificación y cuantificación, gran utilidad en análisis de muestras complejas, gran sensibilidad, capacidad de hacer barridos rápidos, aporte de información estructural e información isotópica, etc. Sin embargo, presenta el problema de operar a alto vacío, lo que en principio parece incompatible con la elución de la muestra por el gas portador. Así mismo, la selectividad y la sensibilidad pueden ser mejoradas usando distintos modos de ionización. Para el análisis de triazinas y organofosforados es útil el modo de impacto electrónico (EI). Para pesticidas con grupos nitro y cloro suele ser altamente selectiva la ionización química negativa (NCI), dado que estabiliza la carga negativa (Stan H.J., Kellner G., 1989). La ionización química positiva (PCI) ha sido empleada para pesticidas organofosforados (Stan H.J., Kellner G., 1989) y triazinas (Rostad C.E., et al., 1989).

Tabla 4. Características generales detectores de GC empleados (Francis Rouessac 2003)

DETECTOR	ACRÓNIMO	TIPO	LÍMITE DE DETECCIÓN
Ionización termoiónica	NPD (TID)	Selectivo	0.4 pg N/s 0.2 pg P/s
Captura electrónica	ECD	Selectivo	0.1 pg Cl/s (función estr)
Fotometría de llama	FPD	Selectivo	20 pg S/s 0.9 pg P/s
Espectrometría de masas	MSD	Universal Específico.	10 pg (SIM) 10 ng (SCAN)

La **espectrometría de MS/MS acoplada a un GC**, es la que emplearemos en el caso práctico que evaluaremos en el presente trabajo.

Consiste en ionizar la muestra en la fuente de ionización, se selecciona una masa determinada en el analizador 1 (AM1) que se dejará pasar hasta la cámara de colisiones, en donde los iones del gas que se han dejado pasar son fragmentados de nuevo dando lugar a fragmentos neutros e iones. Los iones que salgan de la cámara serán analizados el analizador 2 (AM2). A este proceso es conocido como disociación inducida por colisiones (gráficamente en la Figura 11).

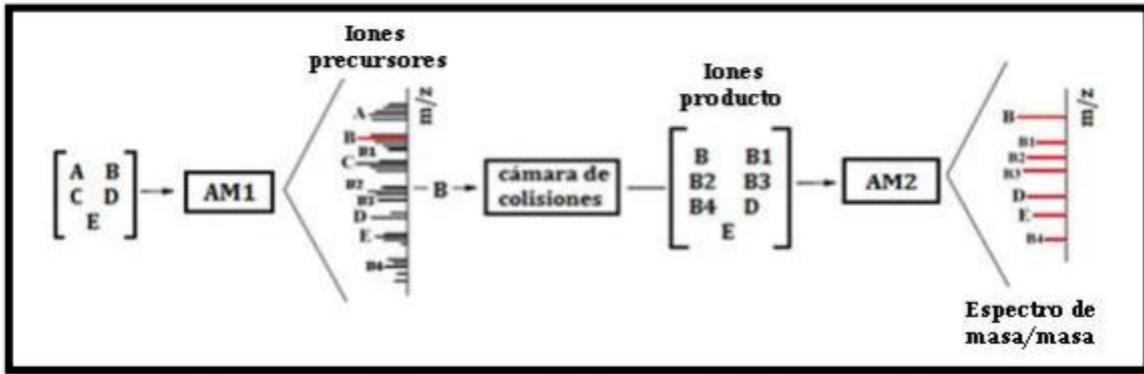


Figura 11. Descripción del funcionamiento de un sistema MS/MS (Ramírez, L., 2009)

Existen dos tipos de analizadores, la **trampa de iones** y los de **triple cuadrupolo (QqQ)**, siendo este segundo el empleado en el caso práctico (Figura 12).

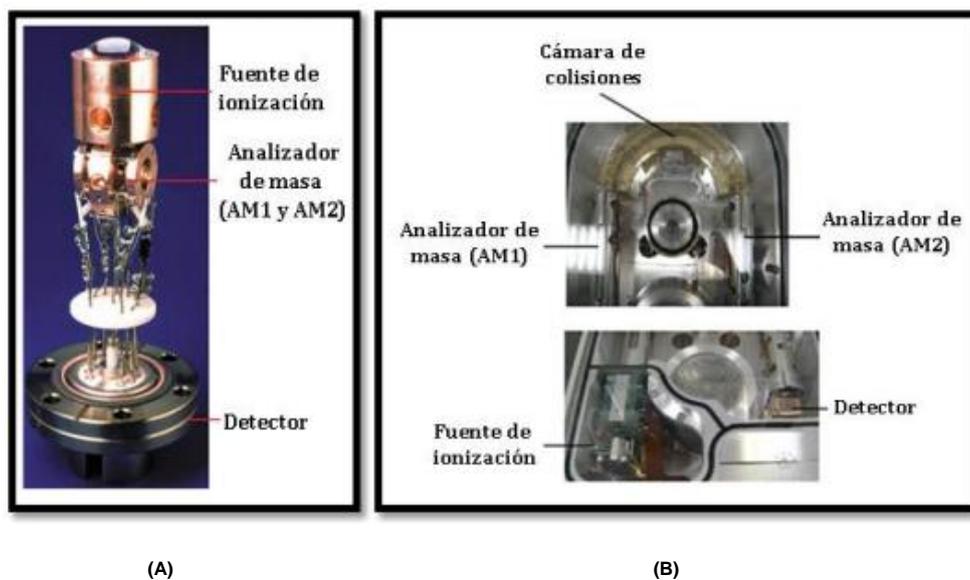


Figura 12. Tipos de analizadores. A) Trampa de iones. B) Triple cuadrupolo (QqQ) (Ramírez, L. 2009)

Los de **trampa de iones** son más vulnerables a cantidades elevadas de iones cargados, reduciéndose la calidad del espectro y permiten realizar un solo monitoreo, el escaneo del ion seleccionado. Los de **triple cuadrupolo** realizan monitoreos más rápidos que el de la trampa de iones. Además, permiten realizar modos de monitoreo distintos como son el monitoreo de reacción múltiple (permiten el escaneo, confirmación y cuantificación en un solo análisis), el monitoreo de reacción seleccionada (SRM) y el monitoreo de un ion seleccionado (SIM). Estos dos últimos, permiten identificar, y cuantificar simultáneamente una gran cantidad de pesticidas a niveles de trazas, gracias a la alta selectividad y rapidez de adquisición de datos

que ofrecen. La desventaja de los monitoreos en los que se seleccionan la reacción o el ión, es que no permiten identificar todos los pesticidas que pudiese contener la muestra como sería en el caso del modo full SCAN.

Con la técnica de MS/MS conseguiremos tener un mayor grado de certeza en la identificación de pesticidas en comparación con la técnica de GC-MS de una única etapa. Se evitan en gran medida las interferencias que ocasionen ciertos componentes de la matriz que dificultan la identificación, obteniendo una información espectral más nítida. Podemos cuantificar de manera incuestionable pesticidas a nivel de trazas (ppm y ppb).

3.3.2. Cromatografía de líquidos.

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía de alta eficacia (HPLC) es la más conocida. Su campo de aplicación cubre gran parte del ámbito de la cromatografía de gases a la que se le añade el correspondiente análisis de compuestos termosensibles o de aquellos con masas moleculares muy grandes e incluso polares, es decir, su uso es muy generalizado.

Los equipos de HPLC están compuestos de varios módulos con unas funciones bien definidas, que están integradas en la misma carcasa para los modelos estándar, o bien se presentan en bloques diferentes, unidos entre ellos. Destacamos la fase móvil (disolventes), los desgasificadores, la bomba, los inyectores, la columna y el detector.

La columna está compuesta de tubo de acero recto de longitud y diámetros variables, los cuales repercutirán en las cantidades consumidas de eluyente y la resolución. Menor consumo de disolvente y mayor resolución, cuanto más estrechas sean las columnas, además de mostrar una mayor sensibilidad y facilitar el acoplamiento de HPLC/MS. La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados entre sus extremidades, y pueden ser de distinta naturaleza. A través de las columnas pasará la muestra y el eluyente arrastrará los analitos de interés hacia el detector.

El detector es la parte del sistema que nos indicará la presencia de diferentes analitos en la muestra. Debe ser capaz de dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensible, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo. Existen varios tipos de detectores, como son el detector UV, fotodiodos, integrados (diodo- array) y fluorescencia (FLD), pero hablaremos solo de los más comunes.

- Detector fluorimétrico (FLD): Los compuestos fluorescentes reemiten, en forma de luz, todo o una parte de la radiación de la fuente luminosa a la que están sometidos. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de la sustancia a condición de que esta sea débil. El campo de aplicación de este detector, muy sensible y selectivo, puede ampliarse aplicando reacciones de formación de derivados fluorescentes. Estos detectores son de gran utilidad, por ejemplo, en el análisis de N- Carbamatos en alimentos e hidrocarburos policíclicos aromáticos.
- Detector de fotodiodos: basados en la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$): la absorbancia A de la fase móvil se mide a la salida de la columna, a una o varias longitudes de onda λ en el UV o en el visible. La intensidad de la absorción depende del coeficiente de absorptividad molar ϵ_{λ} característico, lo que hace imposible el cálculo de las concentraciones de cada una de las especies detectadas por medida directa de las áreas de los picos, que no consideraría estos coeficientes de absorptividad específicos. La fase móvil debe mostrar una absorbancia despreciable. Es un ejemplo de detección selectiva. Aquellos compuestos que no presenten espectros de absorción aprovechables, se recurre a la formación de derivados de los analitos. La detección puede ser policromática, la cual permite cambiar de longitud de onda durante el análisis o registrar la absorbancia a diferentes longitudes de onda simultáneamente o también percibir todo un campo de longitudes de onda sin interrumpir la circulación en la columna. El detector fila de diodos permite no solamente obtener un cromatograma, sino también proporcionar informaciones espectrales que pueden servir para asegurar la identidad de los compuestos separados.

La técnica de HPLC, también puede acoplarse a un MS, consiguiéndose niveles de sensibilidad y selectividad muy elevados.

4. PARTE EXPERIMENTAL: MÉTODOS Y MATERIAL.

4.1. Método de LUKE.

Es uno de los métodos convencionales cuyo objetivo es la determinación de residuos de plaguicidas mediante el empleo de la cromatografía de gases (GC), acoplada a un detector NPD/ECD/FPD/MS, siendo útil para matrices no grasas (frutas, hortalizas y otros materiales como hojas, arroz, etc.). El diagrama de flujo del procedimiento viene en la Figura 13.

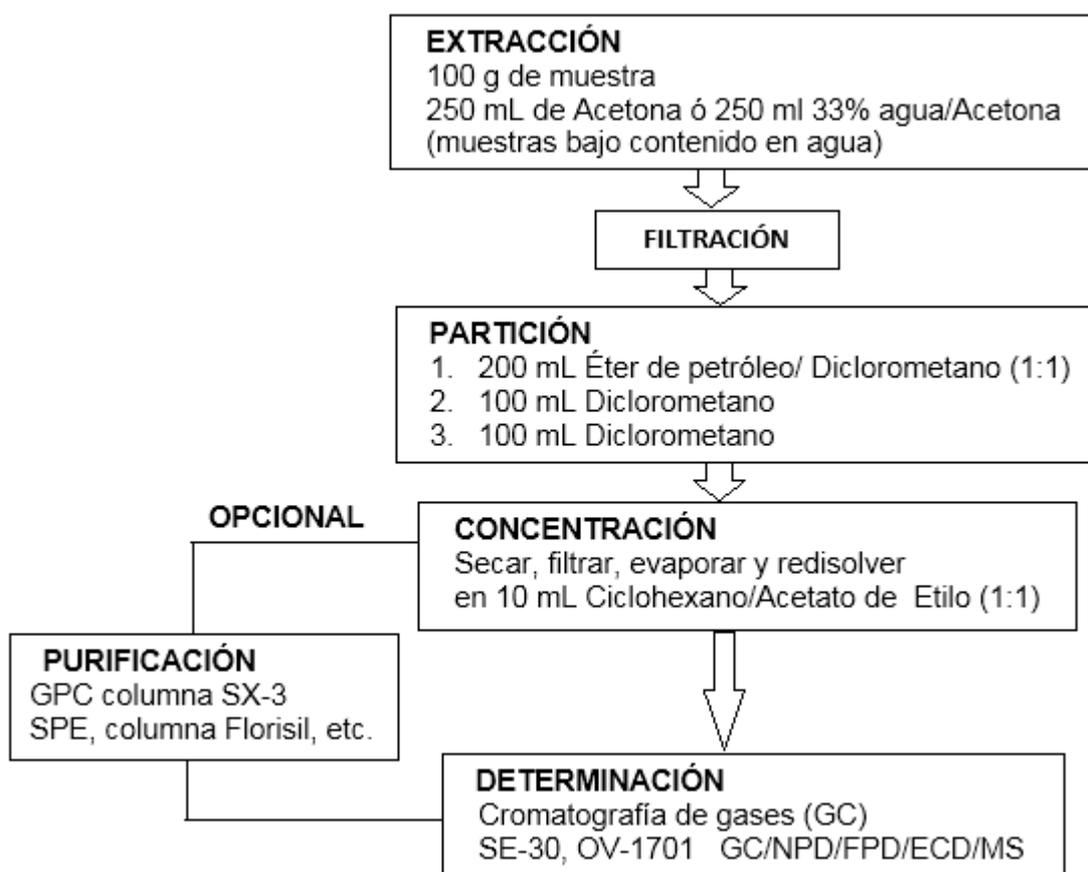


Figura 13. Multiresiduos según método de LUKE (Pesticide Analytical Manual Sec. 302, Productos no grasos)

En la primera etapa, se emplea una mezcla de disolventes orgánicos de diferente polaridad con el fin de llevar a la fase orgánica el mayor número de residuos de plaguicidas que pudiesen existir en la matriz. Así mismo, se hace uso de la fuerza mecánica mediante el empleo de un polytron -turrax para trocear la matriz, de modo que los disolventes y la matriz contenidos en un bote de teflón, pueden interaccionar entre si con mayor proporción y efectividad, gracias al incremento de la superficie de interacción matriz-disolvente. En una segunda etapa, se centrifuga la muestra con el fin de separar el extracto (fase orgánica) de

los restantes interferentes de la matriz. A continuación, se concentra la muestra en un rotavapor y se redissuelve el residuo con ciclohexano /acetato de etilo.

Actualmente este método se realiza en algunos laboratorios con unas pequeñas diferencias. En lugar de 100 g de muestra, se pesan 15 g y se corrigen las cantidades de disolvente empleadas (método mini-LUKE) (Lozano A., 2016). Puede añadirse una sal de Na_2SO_4 durante la extracción con el fin de favorecer la separación de las fases. Una vez extraída la muestra, se realiza la concentración de una cierta alícuota del extracto resultante (tras haberlo decantado previamente en una probeta con la ayuda de un embudo de vidrio) en el interior de un tubo de vidrio de 15 ml, y se procede a la evaporación por corriente de N_2 , controlando que en todo momento la temperatura del baño no supere los 40 a.C. El control de la temperatura es uno de los factores de mayor interés, puesto que una temperatura inadecuada puede producir la descomposición, y por tanto, la pérdida de los plaguicidas que son muy volátiles y sensibles a esta. La evaporación con esta técnica aporta grandes ventajas frente a la clásica del rotavapor, ya que la evaporación es mucho más rápida y nos permite evaporar un elevado número de muestras simultáneamente. El residuo resultante es redissuelto con un disolvente adecuado más un estándar interno (TPP). Con el mini-Luke se consiguen reducir los volúmenes de disolventes orgánicos empleados, disminuyendo los costes y los residuos generados, siendo más ambientalmente respetuoso que el LUKE original, además de reducir los tiempos de procesado, especialmente en la etapa de concentración. El material y los reactivos empleados en el método Luke vienen en la Tabla 5.

Tabla 5: Material y reactivos empleados para el Método de Luke.

MATERIAL EMPLEADO		
Probetas de 100 mL	Pipeta Pasteur	Gradilla viales
Granatario	Tubos de vidrio de 15 mL	Evaporador por corriente de N_2
Matraz erlenmeyer de 250 mL	Encapsulador	Agitador tubos "vortex"
Centrífuga	Baño ultrasonidos	Gradilla tubos de vidrio
Vial de 2 mL para GC y tapa	Pipeta automática de 2 mL	Papel de filtro
Cucharilla	Pipeta automática de 10 mL	
REACTIVOS EMPLEADOS		
Acetona para análisis de residuos	Ciclohexano para análisis de residuos	Diclorometano para análisis de residuos
Estándar interno, trifenílfosfato (TPP)	Éter de petróleo para análisis de residuos	Agua

Para muestras con bajo contenido en agua en la primera fase se añadirá a la muestra una mezcla de 33% agua/ acetona y se procederá de modo idéntico al descrito anteriormente, También cabe la posibilidad de que en una primera fase se realice un proceso de maceración.

La maceración consistirá en una extracción en fase estática, que se puede realizar introduciendo una cantidad de muestra determinada, junto con las proporciones indicadas de disolventes orgánicos, en el interior de un matraz erlenmeyer de vidrio tapado tras varias agitaciones, y se deja en reposo durante 24 horas. Pasado este tiempo decantamos dicha mezcla sobre una probeta, filtrándola al mismo tiempo con la ayuda de un embudo cónico de vidrio y papel de filtro, para evitar el paso de restos presentes en el extracto. La parte restante del proceso es idéntico al de la Figura 13, donde se continuará por la evaporación de una alícuota del extracto.

4.2. Método de MILLS.

Este procedimiento se emplea para la determinación de residuos de plaguicidas (Organoclorados, Organofosforados, etc.) mediante el empleo de la cromatografía de gases (GC), acoplada a un detector NPD/ECD/FPD/MS, siendo útil para matrices grasas (tejidos animales, grasa de pescado, etc.). Así mismo, este proceso puede ser empleado para muestras de semillas, granos, nueces, etc., pero en este caso la extracción se realiza con Éter de petróleo, Éter etílico y Alcohol Etílico. El diagrama de flujo del proceso, encontrado en la bibliografía es el que viene en la figura 14.

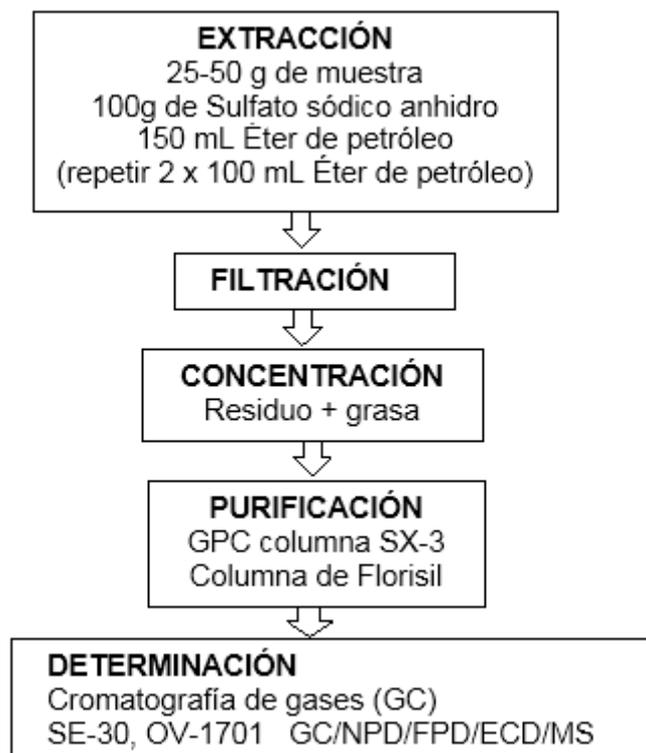


Figura 14. Multiresiduos según método de MILLS (Pesticide Analytical Manual Sec. 304)

Una variante de este método aplicada, a matrices de aceite y aceitunas, en algunos laboratorios de control es el propuesto en la Figura 15.

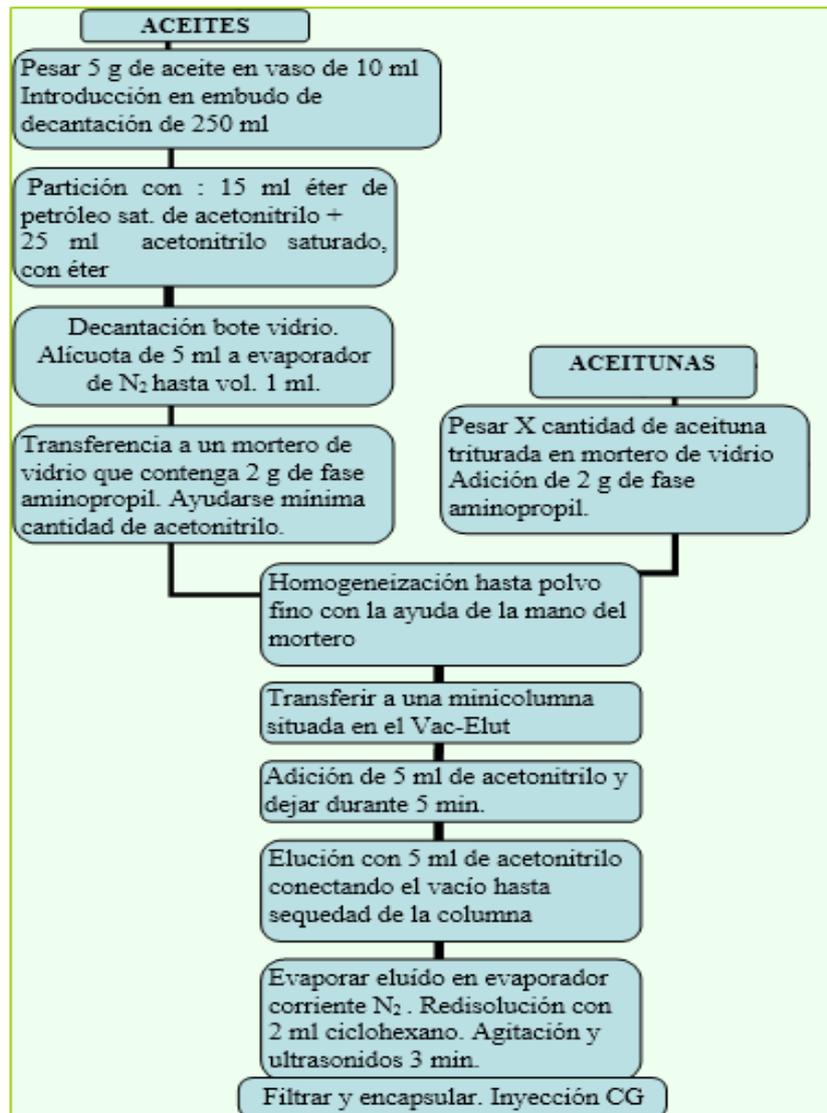


Figura 15. Multiresiduos aplicado a aceites y aceitunas.

Convenría destacar el tratamiento diferenciado que se realizará a las muestras de aceite y aceitunas:

- A la hora de pesar las muestras se debe tener en cuenta el tipo de matriz, puesto que las cantidades variarán: para aceites se pesarán 5 g, para aceitunas trituradas sin hueso 0.8 g y para aceitunas trituradas con hueso 1.0 g.
- Las muestras de aceite serán sometidas a una extracción líquido – líquido clásica, que será llevada a cabo en un embudo de decantación con disolventes orgánicos, con la

finalidad de eliminar la parte grasa del aceite (uno de los componentes mayoritarios del aceite de oliva es la trioleína) y otras impurezas (la fase orgánica de interés será la inferior, la cual contendrá los posibles pesticidas presentes de la muestra), para proceder a continuación a una extracción de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). Es muy importante la adecuada elección de la mezcla de disolventes orgánicos con el fin de asegurar la efectividad de la extracción, puesto que esta va a depender de la polaridad de la misma.

Para llevar a cabo la MSPD, se prepara una mini columna del modo siguiente: Se emplea una jeringa de 10 ml a la que se introduce una pequeña cantidad de lana de vidrio para evitar el paso de partículas de sólido, más 2 g de florisil activado. A esta mini columna finalmente se añadirá la mezcla de la muestra más el aminopropil antes de proceder a la elución. El material de la columna (propileno) será un factor a considerar, puesto que debe ser estable frente al eluyente orgánico que se vaya a emplear, que en nuestro caso es el acetonitrilo. Otro de los factores a tener en consideración, es el tamaño de partícula del adsorbente (florisil activado), puesto que el tamaño no debe ser demasiado pequeño, de modo que permita el paso de la muestra líquida por simple gravitación, aunque como el mantenimiento de dicho flujo va a ser complejo, se aplicará vacío (sistema Vac-Elut Figura 16) de modo que este se acelerará.



Figura 16. Vac- Elut y parte del material empleado.

La aplicación del vacío favorecerá el contacto entre el líquido y la fase sólida, el cual también se ve favorecido por el pequeño tamaño de las partículas del adsorbente, mejorando, por tanto, la eficiencia del proceso. La extracción en fase sólida permite la realización simultánea de 12 a 24 muestras. Es importante esperar 5 minutos tras la adición de los 5 ml de acetonitrilo

primeros, para que el contacto entre la fase sólida y líquida sea máximo, y por tanto, la eficacia de la extracción será mejor. El material y los reactivos empleados vienen en la Tabla 6.

Tabla 6. Material y reactivos empleados para el procedimiento de análisis de aceites y aceitunas.

MATERIAL EMPLEADO		
Vasos de precipitados de 10 mL (*)	Bote de vidrio	Granataario
Embudo de decantación de 250 mL	Lana de vidrio	Pipeta pasteur
Gradilla de tubos de vidrio	Cronómetro	Jeringa de 10 mL
Tubos de vidrio de 10 mL	Gradilla de viales	Mortero
Evaporador de corriente de N ₂	Papel de parafilm	Mano mortero
Viales GC de 2 mL y tapa	Filtro de 0,45 µm	Embudo de sólidos
Cucharilla	Encapsulador	Pipeta automática de 5 mL
Jeringa de 5 mL	Ultrasonidos	Dosificadores (*)
REACTIVOS EMPLEADOS		
Acetonitrilo saturado de éter de petróleo	Ciclohexano para análisis de residuos	Acetonitrilo para análisis de residuos
Florisil activado	Éter de petróleo saturado de acetonitrilo	Fase aminopropil
(*) Sólo será empleado en el caso del tratamiento de aceites		

4.3. Método 2,4- D y Dichlorprop (2,4- DP).

Los residuos de 2,4-D y Dichlorprop (2,4-DP), pueden estar presentes como ácidos libres, sales o ésteres en la materia vegetal y se extraen con una solución acuosa de metanol. El metanol del extracto se evapora en medio alcalino, donde los ésteres estarán hidrolizados. La partición de los extractos se realizará con diclorometano en medio acuoso, y entonces los compuestos se esterifican con una mezcla de metanol y ácido sulfúrico. Los metil- ésteres obtenidos, procedentes de 2,4- D y del Dichlorprop, se cuantifican por cromatografía de gases con detector de captura de electrones y columna capilar de sílice fundida. Este método es aplicable a matrices muy diversas (cereales, uvas, hierbas, etc.).

El diagrama de flujo del procedimiento que viene descrito en la Figura 17 requiere de varias consideraciones previas. La primera de ellas es que la cantidad de muestra pesada será de 50 g en matrices como la uva, etc., salvo en el caso de tratarse de paja que pesaríamos 20 g. La segunda es que pueden distinguirse tres etapas perfectamente: Extracción, partición líquido- líquido y metilación. En la etapa de extracción, se realiza una homogeneización de la muestra con una mezcla de metanol: agua con la ayuda del homogeneizador “*Ultraturrax*”. El bote que contiene a la muestra se introduce en un baño de agua - hielo durante los 10 min.

que durará la homogeneización, para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. La filtración de la fase diclorometano que se hace sobre Na_2SO_4 anhidro, se llevará a cabo introduciendo una pequeña cantidad de lana de vidrio en un embudo de vidrio sobre la que se colocará el Na_2SO_4 anhidro necesario. La boca del embudo se situará en el interior de un balón de 10 ml, recogiendo de este modo la fase filtrada que será llevada al rotavapor para concentrar el extracto. El lavado se realiza con NaHCO_3 que tiene como finalidad la neutralización o eliminación de los posibles restos de H_2SO_4 que pudiesen quedar. El material empleado viene en la Tabla 7.

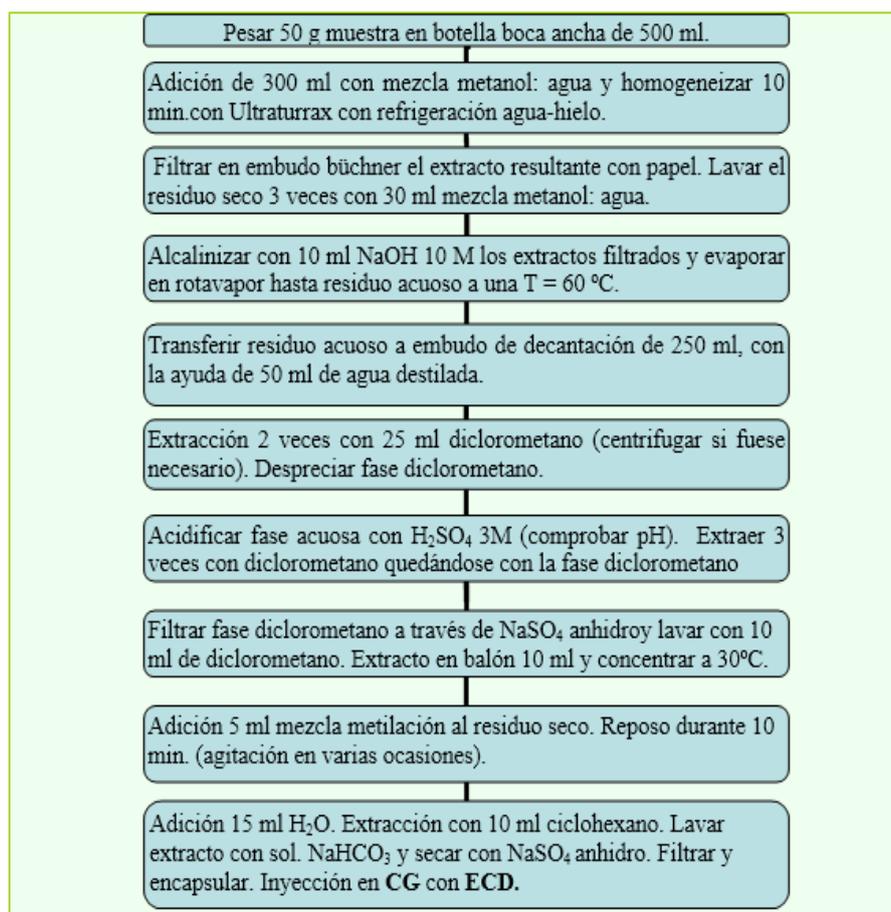


Figura 17. Extracción de 2,4- D y Dichlorprop (2,4- DP).

Tabla 7. Material y reactivos empleados para el método 2.4-D y Dichlorprop (2.4-DP).

MATERIAL EMPLEADO		
Botella boca ancha de 500 mL	Microjeringa de 10 mL	Papel de filtrado rápido de 9 cm
Homogeneizador "Ultraturax"	Quitatasos de 500 mL	Balones de destilación de 200 mL y 1 L
Probeta 50 mL y embudo de vidrio	Embudo de decantación 50 y 250 mL	Centrífuga con tubos de vidrio de 250 mL
Embudo Buchner 9 cm de diámetro	Rotavapor con baño a 30, 40 y 60 °C	Cromatógrafo con ECD
REACTIVOS EMPLEADOS		
Mezcla metanol-agua	Agua destilada	Acetato sódico anhidro
Diclorometano para análisis de residuos	Ácido sulfúrico 3 M	Ciclohexano para análisis de residuos
Sulfato sódico anhidro	Mezcla metilación (metanol+ H_2SO_4 concentrado)	

4.4. Método Acetato de Etilo.

Han sido descritos en la bibliografía diversos métodos basados en el empleo del acetato de etilo para diferentes grupos de pesticidas en frutas y vegetales (Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003), los cuales proporcionan buenas recuperaciones para un espectro amplio de pesticidas con propiedades diferentes. Su principal ventaja es que el acetato de etilo es menos contaminante que los disolventes organoclorados. El diagrama de flujo del procedimiento viene en la Figura 18.

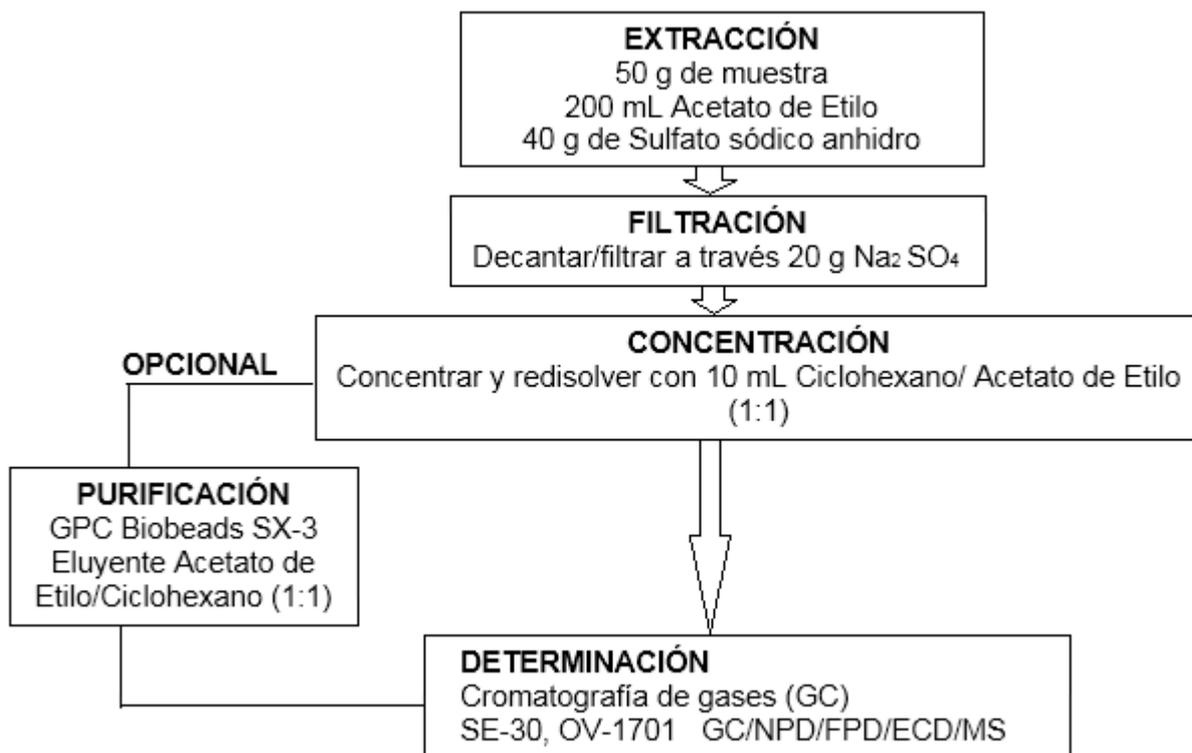


Figura 18. Método Acetato de Etilo

Se ha encontrado en la bibliografía la validación de 210 pesticidas analizados por GC-MS/MS en los que se emplea este método del acetato, pero reduciendo las cantidades de muestras y disolventes empleadas (Uclés S. et al., 2014). En particular 10 g de muestra se extraen con 10 ml de acetato de etilo y se le añaden 1.5 g de NaCl y 8 g de Na₂SO₄.

4.5. Método N- Metilcarbamatos.

El objetivo de este método es determinar el contenido de residuos en Carbofurano, 3-OH-Carbofurano, Metomilo, Propoxur y Carbaril en frutas y hortalizas por HPLC. Según viene descrito en el diagrama del flujo de la Figura 19, las muestras vegetales son extraídas con

una mezcla de acetonitrilo saturado de ciclohexano. Se concentra la fase de acetonitrilo, se enrasa el extracto a 20 mL y una alícuota del extracto se purifica con cartucho de aminopropilo en base sílice, haciendo una extracción en fase sólida (SPE). El extracto resultante se analiza por cromatografía líquida con detector de fluorescencia.

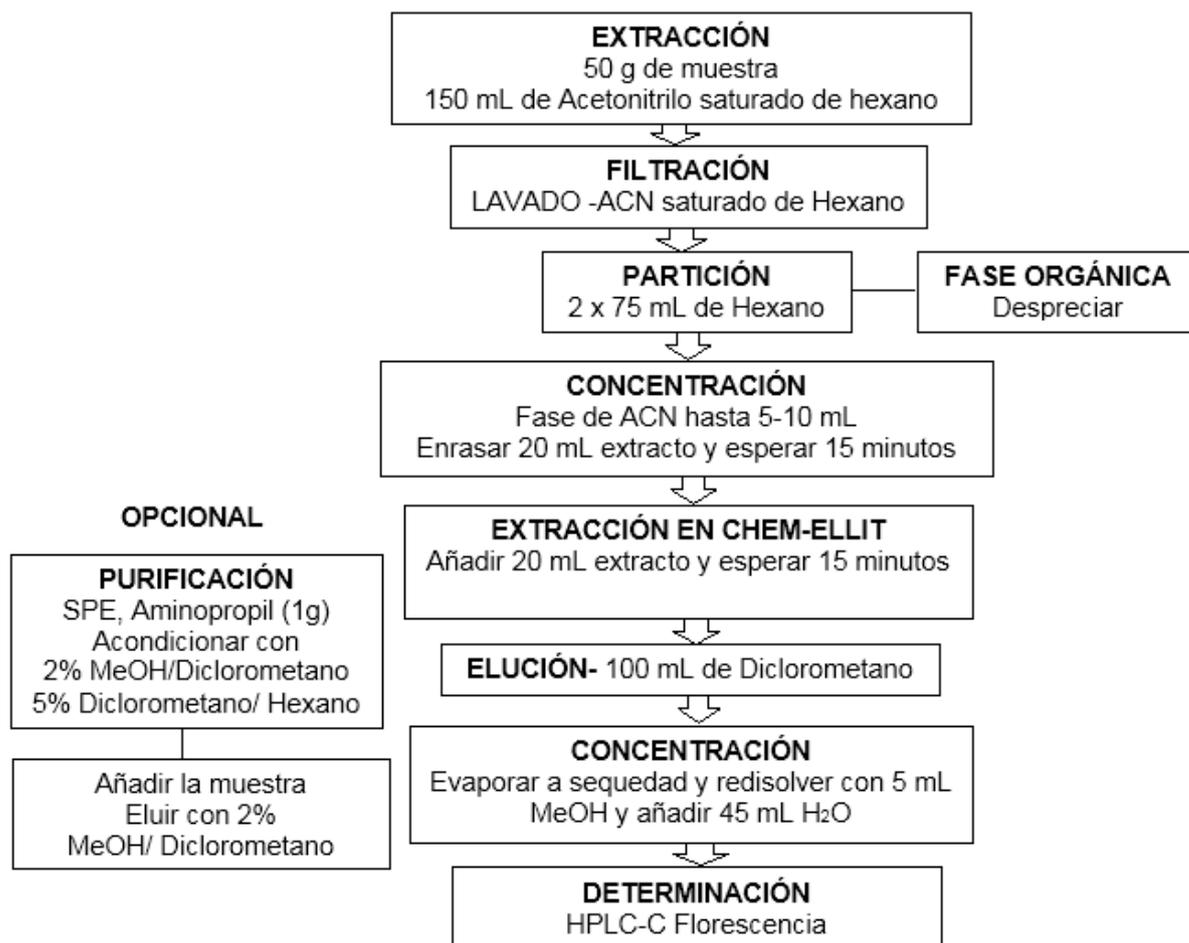


Figura 19. Extracción de N-Metilcarbamatos (carbaril).

4.6. Método de QuEChERS.

El presente método fue descrito en 2003, por Anastassiades como un método "rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro" que en su abreviatura inglesa es conocido como "QuEChERS". Este método es empleado para la realización de análisis multiresiduos de pesticidas en alimentos de muy distinta naturaleza, y cuestiona la viabilidad de los métodos clásicos, introduciendo un uso novedoso de sales como el MgSO₄ para la extracción / partición y una extracción de dispersión en fase sólida para la limpieza (Clean-up). Mediante esta metodología QuEChERS se exprime al máximo el amplio alcance y el alto grado de selectividad y sensibilidad que presentan las técnicas de cromatografía de gases y líquidos

(GC y LC) acopladas a la espectrometría de masas (MS/MS), que como sabemos se han convertido en las herramientas analíticas principales en la mayoría de los laboratorios de control de plaguicidas. La combinación del QuEChERS con estas técnicas instrumentales, ha adquirido gran popularidad por poseer unas características optimizadas, unos beneficios prácticos y unos excelentes resultados. En nuestro trabajo vamos a estudiar con profundidad los resultados obtenidos y la validación realizada combinando el método con la técnica GC-MS/MS.

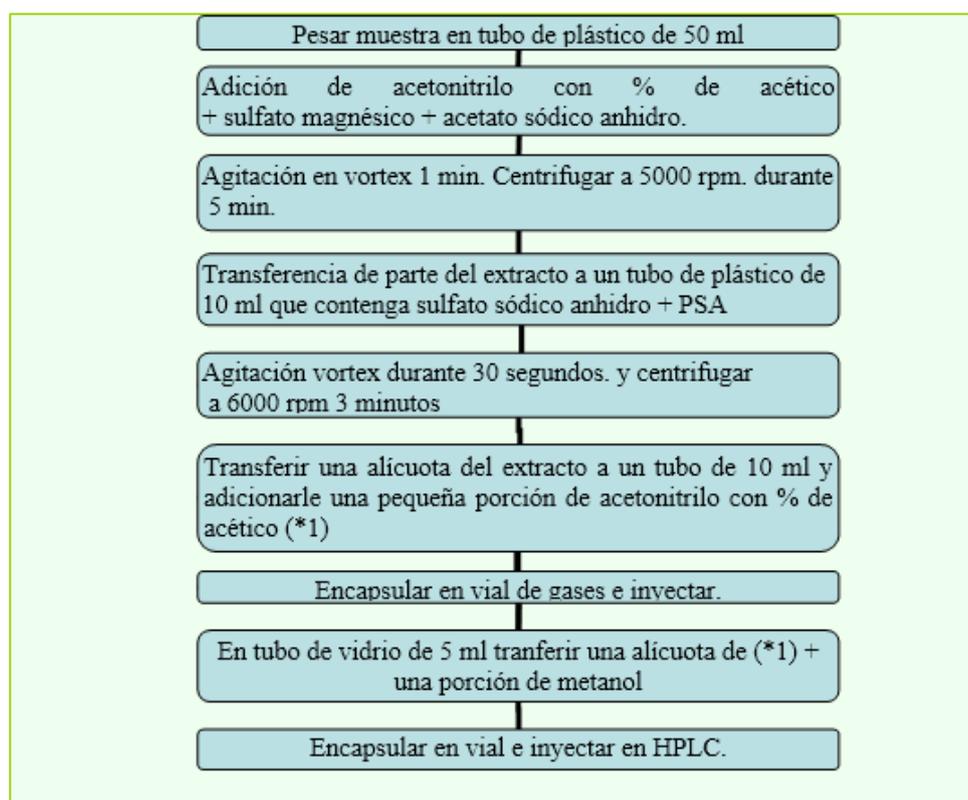


Figura 20. Extracción método QuEChERS primitivo.

La figura 20 representa una de las primeras versiones del método QuEChERS, siendo aplicable para la inyección de las muestras por GC (en fase de acetoneitrilo) o por HPLC (en fase metanol).

La base de este método es el desarrollo de una extracción dispersiva en fase sólida, pero que no se lleva a cabo como en el análisis de aceites convencional que anteriormente hemos descrito, donde se empleaban columnas preparadas manualmente. En esta técnica se consigue extraer rápidamente el agua residual y los compuestos que no son objeto de ensayo (interferentes), por medio de la utilización de $MgSO_4$ anhidro (para la eliminación de agua residual de las muestras) y un adsorbente que será una amina primaria o secundaria (PSA = N-propiletildiaminosilano) que elimina los azúcares y ácidos de la matriz presentes. Es

empleado el C18 como adsorbente para eliminar grasas no polares, además de otras impurezas de las muestras, tales como pigmentos o esteroides (Lin XY, et al 2018). También es empleado el negro de carbón grafito GCB (Lin XY, et al 2017).

Algunas de las operaciones más empleadas en el proceso son la agitación (se aconseja la agitación manual por ser más vigorosa frente a la mecánica en el método original) la cual favorece el contacto de la matriz -disolventes, y la centrifugación es útil para separar la fase líquida (extracto) del resto de componentes de la matriz. El material y los reactivos empleados son los que vienen reflejados en la Tabla 8.

Tabla 8. Material y reactivos empleados para el método QuEChERS.

MATERIAL EMPLEADO		
Tubos de plástico de 10 y 50 mL con rosca	Agitador "vortex"	Dosificador de 15 mL
Centrifugas	Cucharilla	Embudo de sólidos pequeño
Vidrio reloj	Pipetas automáticas	Gradillas de tubos de plástico y vial
Jeringas de 5 mL	Filtro teflón 0,45 µm	Granatario
Viales con tapa	Encapsulador	Espátulas
REACTIVOS EMPLEADOS		
Acetonitrilo con un % de ácido acético	Sulfato magnésico anhidro	Acetato sódico anhidro
PSA	Metanol para análisis de residuos	Ciclohexano para análisis de residuos

Muchos han sido los estudios posteriores realizados en torno a este método pudiendo demostrarse que algunos pesticidas presentaban una menor estabilidad y / o recuperaciones dependiendo del pH de la matriz (Lehotay, S. J. et al., 2010). Los autores del método QuEChERS optimizaron el método con algunas modificaciones de pH durante el proceso de extracción (pH-5) en las que observaron un equilibrio óptimo para lograr recuperaciones aceptablemente altas (> 70%), pero posteriormente plantearon estudios alternativos. En el caso de Lehotay et al., emplearon condiciones relativamente fuertes de tamponamiento de acetato y Anastassiades et al., eligieron condiciones de amortiguamiento de citrato más débiles en términos de fuerza iónica.

Ambas versiones de estos métodos pasaron por un extenso ensayo interlaboratorio, en el que participaron centenares de laboratorios, obteniendo una cuantiosa cantidad de datos para decenas de plaguicidas fortificados de diferentes niveles sobre diferentes matrices y mediante el empleo de diferentes tipos de condiciones e instrumentos de GC-MS/MS y LC-MS/MS. Ambos métodos alcanzaron éxito, según los criterios de aceptabilidad de estándares internacionales, con la versión tampón de acetato, siendo acreditados en ISO/IEC

17025:2005, convirtiéndose en AOAC Método oficial 2007.01. En la página de la EURL-FV podemos encontrar muchos datos de ensayos de validación en diferentes matrices y métodos analíticos http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?LabID=500&CntID=828&Theme_ID=1&Pdf=False&Lang=EN.

En la Figura 21, tenemos el diagrama de otra variante del método QuEChERS de las muchas que podemos encontrar en la bibliografía, en las que se introducen pequeños cambios en ciertas etapas del proceso, pero se mantiene intacto su fundamento.

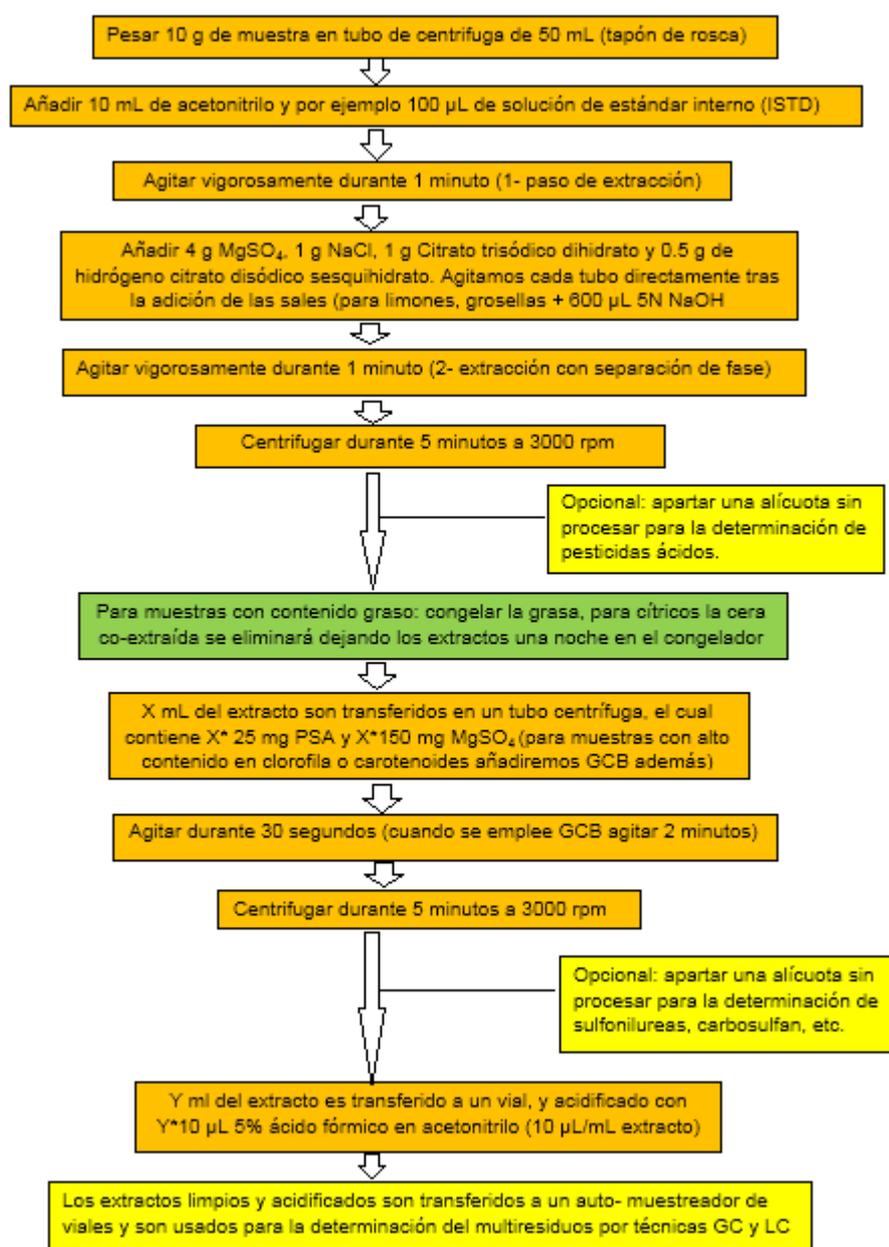


Figura 21. Extracción método QuEChERS modificado (Michelangelo Anastassiades, CVUA Stuttgart).

4.6.1. Aplicaciones del método QuEChERS.

Son infinitas las aplicaciones del método QuEChERS. Son numerosos los estudios que pueden encontrarse en la bibliografía en los que se aplica esta metodología con pequeños cambios, aplicándolo a un amplio número de plaguicidas y matrices. Los cambios se introducen esencialmente en la etapa de limpieza (Clean-up), aunque aparecen cambios de otra naturaleza. El efecto en la proporción de los adsorbentes empleados ha sido objeto de estudio, obteniéndose mejores resultados cuando se empleó una mezcla de PSA, C18 y GCB en la validación de 189 pesticidas en grosellas negras. Así mismo, se inyectaron muestras diluidas en tolueno y en acetonitrilo estabilizado con 1% de ácido fórmico para estabilizar a los pesticidas sensibles al pH (Walorczyk S.; 2014). En la figura 22, vemos los cromatogramas (TIC) GC-MS obtenidos tras la aplicación del Clean-up con distintos adsorbentes.

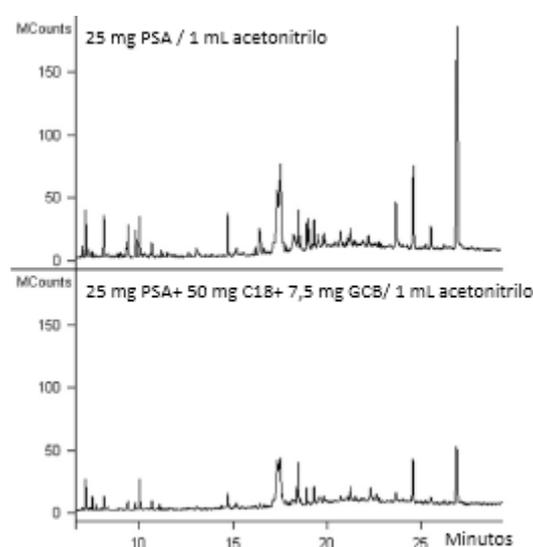


Fig. 22. Cromatograma (TIC) GC-MS tras clean-up con PSA(25mg por 1mL ACN)
y PSA+C18+GCB (25 mg+50 mg+7.5mg por 1mL ACN), m/z 95–600 (Walorczyk S.; 2014).

Los aceites vegetales comestibles también fueron objeto de estudio, optimizándose el QuEChERS, para el análisis de 255 pesticidas con un amplio rango de polaridades, desde los altamente polares como el Dichlorvos o el Methamidophos, o los más altamente lipofílicos como los organoclorados y los piretroides. Se ensayaron diversas mezclas para el Clean-up, observándose que el de mayor capacidad era el EMR (NaCl/ MgSO₄ (1:4)) (He Z. et al., 2017). Para el análisis de arroz y harina de trigo se añadieron 10 ml de agua a la muestra y se procedió a la extracción con acetato de etilo, en lugar de acetonitrilo. Se empleó una mezcla de C18 + PSA + MgSO₄, para el Clean-up, cuya cantidad fue mayor en harinas por su mayor contenido graso. Además se emplearon cartuchos de florisil para las harinas (Grande A. et

al., 2016). Es frecuente también, el empleo del ultrasonido para facilitar la extracción. Es el caso de la extracción de Bromotalonil en manzanas y suelos dando unos valores de recuperación 80.8%- 106%. El disolvente de extracción es el acetato de etilo (Liu H. et al., 2014).

El análisis de piretroides en frutas y hortalizas también aparece en la bibliografía, destacando el empleo de una columna de retro-lavado combinada con el GC-MS/MS, evitando con ello que las impurezas con alto punto de vaporización queden acumuladas en la columna cromatográfica, especialmente en muestras muy sucias, mejorando la sensibilidad y confiabilidad de los análisis, así mismo para el Clean-up se emplean mezclas de C18, PSA y MgSO₄, dando buenos valores de recuperación (Lin XY., 2018). Herbicidas como el Metribucina y sus metabolitos en tomate pudieron analizarse obteniéndose magníficas recuperaciones cuando el disolvente empleado era el acetonitrilo, mientras que en casos con otros disolventes como la acetona daban valores por encima del 120% o que apenas alcanzaban el 43 %. Así mismo, se empleó el GCB que es altamente efectivo para la eliminación de pigmentos de estructura planar contenidos en el tomate (Xie, YL. et al., 2017).

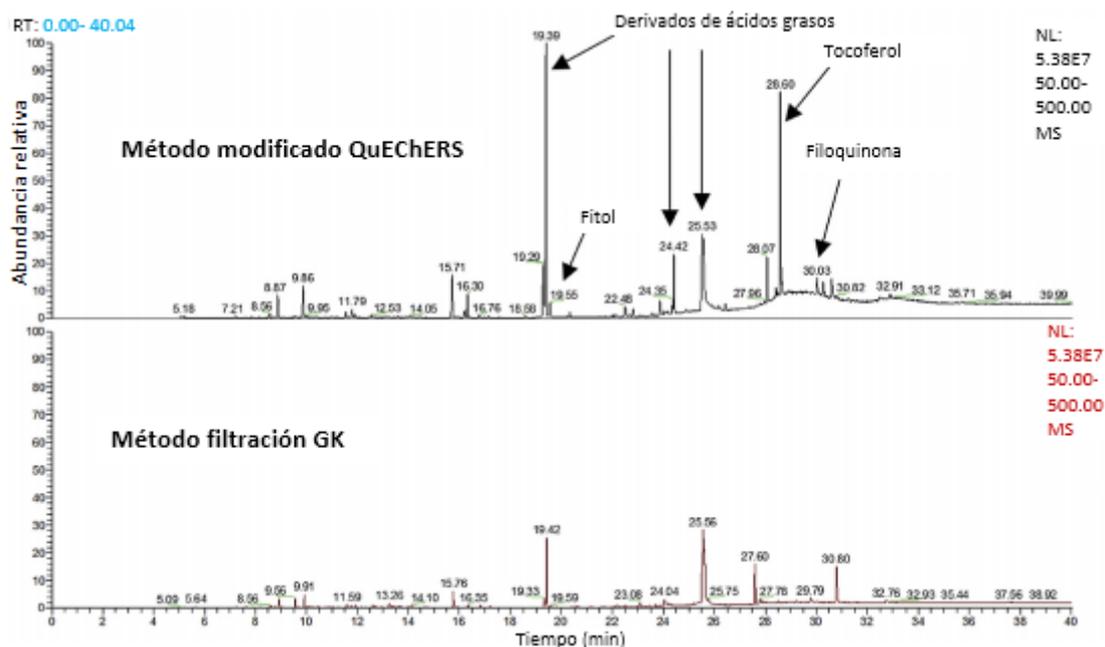


Figura 23. Cromatograma GC/MS de blanco de espinacas obtenido con el QuEChERS modificado y con métodos de GK filtración (Hong J. et al., 2016).

Muestras de espinacas se analizaron empleando 3 membranas diferentes: NFW, membrana de poliamida; NP030, membrana de polietersulfona; XN45, membrana de amida polipiperazina, con similares valores de MWCO (límites de peso molecular, en inglés

“*Molecular Weight Cut-Off*”) (300 a 600 Da), ensayándose a la vez con 3 disolventes de elución como el acetonitrilo, el metanol y una mezcla de acetonitrilo- agua (1:1, v/v). La mejor purificación se obtuvo con acetonitrilo-agua (1:1, v/v). La principal razón puede ser debida a la mayor solubilidad que tienen acetonitrilo y metanol, que provocarían hinchazón en la membrana o que debido al efecto hidrofóbico típico de las moléculas no polares se excluían las moléculas de agua. Los resultados revelaron que la membrana GK fue la membrana más eficaz, aunque los valores de recuperación eran algo inferiores a los obtenidos por el QuEChERS modificado (Figura 23). La mayoría de los interferentes fueron eliminados o disminuidos por Método de filtración GK, mientras que estos materiales de interferencia fueron retenidos por el método QuEChERS modificado (Hong J. et al., 2016).

Se han realizado estudios de comparación del método QuEChERS con otros procesos de extracción como son el método del acetato de etilo y la aplicación de una MSPD sobre matriz de alcachofa (Machado I. et al., 2017). Los resultados determinaron que se obtenían mejores valores de recuperación con el QuEChERS de citrato, según vemos en la Figura 24 y 25.

Nombre común pesticida	Método QuEChERS		Método Acetato de etilo		Método MSPD	
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)
Azoxistrobina	86.0	14.4	39.6	11.0	72.5	2.9
Boscalid	82.1	14.9	28.2	8.3	70.9	1.8
Clorfenvinfos	79.2	8.4	44.1	6.8	–	–
Cipermetrina	118.5	11.2	104.2	8.6	100.3	4.5
Deltametrín	114.2	15.1	100.6	8.6	–	–
Difenoconazol	85.6	6.8	71.2	11.3	–	–
Iprodiona	109.0	9.1	49.4	9.4	–	–
Lambda-Cihalotrín	73.4	13.7	70.5	6.7	104.5	43.7
Metiocarb	84.5	11.6	81.5	7.7	81.6	11.9
Propiconazol	86.0	7.0	83.9	3.1	–	–
Piraclostrobina	90.4	25.0	–	–	–	–
Tau-Fluvalinato	116.6	16.4	100.5	6.4	94.6	4.0
Tebuconazol	80.8	20.4	136.3	10.0	–	–
Tetradifón	107.8	10.3	107.0	8.0	104.1	18.1
Metiocarb	113.9	14.9	57.3	12.2	89.5	14.3

Figura 24. Resultados de 3 métodos de extracción evaluados por GC-MS (nivel 0.2 mg/kg). % réplicas por cada método (Machado I. et al., 2017)

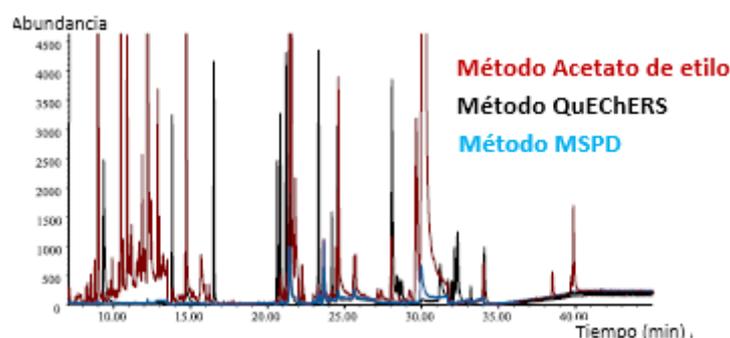


Figura 25. Cromatograma GC-MS full Scan para un blanco de alcachofa para 3 métodos de extracción. (Machado I. et al., 2017)

En el anexo 6, tenemos algunos campos de aplicación del método QuEChERS.

4.6.2. Trabajo seleccionado de determinación de 121 residuos de pesticidas en frutas y vegetales por GC-MS/MS empleando el método de QuEChERS.

En el estudio que nos ocupa se propone aplicar un método multiresiduos para identificar y cuantificar químicamente 121 plaguicidas, entre los que se incluyen insecticidas, herbicidas y fungicidas que aparecen con cierta frecuencia en frutas y verduras (tomate, pimiento, lechuga, pepino, berenjena, calabacín, melón, sandía y manzana). El método que se ha seguido corresponde con el QuEChERS (Anastassiades et al., 2003; Lehotay et al., 2010; EN 15662: 2008 estándar, 2008) con algunas modificaciones, seguido de un análisis GC-MS/MS (QqQ). El método original EN 15662: 2008 usa una proporción de 1:1 (mg de muestra / ml acetonitrilo).

El método fue evaluado y validado individualmente para nueve matrices diferentes de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Europea sobre la veracidad, la reproducibilidad, sensibilidad, especificidad y solidez (Decisión de la Comisión 2002 /657/EC, 2002) y acreditado por ISO / IEC 17025: 2005 estándar internacional con número de acreditación 278 / LE1027 (ISO / IEC17025: 2005, 2005). En la Tabla 9 tenemos los reactivos empleados.

Tabla 9. Estándares y reactivos empleados para el método QuEChERS (Camino-Sánchez, F.J, et al., 2011).

ESTÁNDAR Y REACTIVOS EMPLEADOS
121 estándares de plaguicidas, comprados del Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburgo, Alemania)
Acetonitrilo y acetona para el análisis de residuos, comprados de Panreac (Barcelona, España)
Amina primaria o secundaria (PSA = N-propiletilendiaminosilano), adquirida en Varian Inc. (Palo Alto, CA, EUA)
Cloruro sódico adquirido de Panreac (Barcelona, España)
Sulfato de magnesio, adquirido de Panreac (Barcelona, España)
Sulfato de sodio, adquirido de Panreac (Barcelona, España)
Citrato trisódico deshidratado, adquirido de Panreac (Barcelona, España)
Hidrocitrato de disodio sesquihidrato, adquirido de Panreac (Barcelona, España)
Ácido fórmico, adquirido de Panreac (Barcelona, España)
Patrón interno Trifenilfosfato (TPP)
Agua purificada con un sistema Milli-Q plus (Millipore, Bedford, EE. UU.)

La preparación de los patrones es una tarea casi constante durante el trabajo en el laboratorio, obteniéndose a partir de Materiales Certificados de Referencia (MCR) estables, homogéneos (misma composición en todas sus partes), del mismo tipo que las muestras que se van a analizar y contenido similar. Estos materiales son obtenidos y distribuidos por organismos públicos y privados, por ejemplo, *Institute for Reference Materials and Measurements* (Unión Europea), etc., aunque también pueden emplearse como materiales de referencia a productos que hayan sido objeto de un ejercicio interlaboratorio. A partir de estos MCR se suelen

preparar patrones de concentración de 1000 ppm. Las disoluciones se preparan en concentraciones elevadas para favorecer su mantenimiento las cuales serán guardadas en nevera a 4 °C, o en algunos casos a T < 20 °C. A partir de estas disoluciones patrón de 1000 ppm, se prepararán mediante sucesivas diluciones patrones de concentraciones inferiores que son empleados en todos los procedimientos, de ahí la importancia de la correcta preparación de los patrones.

En el estudio que nos ocupa, las soluciones estándar fueron preparadas de la siguiente manera: se pesaron 20.0 mg del estándar puro y se diluyeron con acetonitrilo en un matraz aforado de 50 ml. De las soluciones stock individuales se preparó una solución mezcla de todos ellos de 1.0 mg/L. Todas estas soluciones fueron almacenadas en un congelador a T < 20°C. Para dicho ensayo también fue empleado un patrón interno, que fue una solución de Trifenilfosfato (TPP) de 250 mg/ L en acetonitrilo.

Los análisis se llevaron a cabo mediante el empleo de un cromatógrafo de gases (VARIAN) acoplado a un masas, con las características indicadas en la Tabla 10. En ella también aparece el tipo de software empleado para el control y el análisis de los datos.

Tabla 10. Instrumentación y software utilizados en el análisis (Camino-Sánchez, F.J, et al., 2011).

INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	
EQUIPO DE GASES Y MASAS	Cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Palo Alto, CA, EE. UU.)
	Inyector de gran volumen 1079 split / splitless (LVI)
	Detector triple cuadrupolo Varian 1200 acoplado al cromatógrafo de gases
	Muestreador de líquidos automático Varian 8400 con jeringa de 100 µl para inyectar las muestras
	Liner RESTEK (Penn Eagle, CA, USA) split con frits y desactivación Siltek
	Columna capilar Varian Factorfour VF-5MS (30 m longitud x 0,25 mm diámetro x 0,25 µm de espesor de película)
	Columna de protección (0,25 mm diámetro) se usó para prevenir entrada de compuestos no volátiles
	Masas modo SMR, con ionización de impacto electrónico a 70 eV
SOFTWARE	Varian MS Workstation 6.9 (Varian), para control y análisis de datos
	Statgraphics Centurion Paquete de software XV versión 15.1.02
GAS PORTADOR Y DE COLISIÓN	Gas portador: Helio pureza del 99,9999% suministrados por PRAXAIR España, S.L (Madrid, España)
	Gas de colisión Argón, pureza del 99,9999% suministrados por PRAXAIR España, S.L (Madrid, España)

Para llevar a cabo el proceso de extracción se empleó además una centrífuga Damon/IEC (MA, USA) de tubos de 50 mL, entre otros materiales como triturador, balanzas, material volumétrico.

La preparación de las muestras se llevó a cabo siguiendo el método QuEChERS (figura 21), pero introduciendo unas pequeñas modificaciones.

- Distinta relación mg muestra/mL acetonitrilo. Por tanto, se pesaron 15 g de muestra en tubos de Teflón de 50 mL, en lugar de 10 g de muestra (relación 1.5 muestra/1 acetonitrilo).
- Se añadieron 150 μ l de estándar interno TPP, en lugar de 100 μ l.
- Las cantidades de sales añadidas fueron: 6 g de sulfato magnésico anhidro, 1.5 g cloruro sódico anhidro, 1.5 g de citrato trisódico deshidratado y 0.75 g de hidrogeno citrato disódico sesquihidratado. El Clean-up se realizó con 125 mg PSA y 750 mg de sulfato sódico anhidro.

Los laboratorios de control que emplean métodos validados disponen de controles de calidad interna, de modo que cada muestra o conjunto de muestras debe ir acompañada de un testigo (blanco), curva de calibrado y sus reforzados (recuperación, adicionados).

Los testigos (blancos) se obtienen a partir de una matriz de características conocidas, en cuanto a la cantidad de plaguicidas, y que no contienen al analito de interés. Al blanco- matriz se le realiza un tratamiento similar al ejecutado sobre las muestras. Con el extracto resultante de la metodología QuEChERS se prepara la curva de calibración, de modo que se añaden 200 μ l de un estándar interno de concentración conocida a 1 ml de extracto del blanco. Con el fin de mantener la misma proporción matriz-disolvente en las muestras y estándares de calibración, también debería añadirse 200 μ l de disolvente a todas ellas (similar a lo que se le hace a un blanco). A este procedimiento de calibración se le denomina calibración de adiciones estándar (ISTD). El rango lineal de la curva de calibración fue de 0.006 mg kg⁻¹ a 0.1 mg kg⁻¹, de modo que deben diluirse con extracto de blanco aquellas muestras con una concentración de plaguicida superior a 0.1 mg kg⁻¹. La finalidad es que los valores de concentración de la muestra se encuentren dentro del rango de la calibración. Veamos en la Tabla 11 la preparación de la curva de calibración:

Tabla 11. Preparación puntos de calibración

	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5
Extracto Blanco	1000 µl (1,5 g muestra)				
ISTD	Añadido antes				
Solución estandar (mezcla 121 pesticidas) 1 mg/L	12 µl (0,006 µg)	20 µl (0,01 µg)	40 µl (0,02 µg)	120 µl (0,06 µg)	200 µl (0,1 µg)
Acetonitrilo	188 µl	180 µl	160 µl	80 µl	-
Volumen total	1,2 ml				

Los reforzados, también conocidos como recuperaciones o adicionados, nos permiten conocer la capacidad de recuperación y la selectividad del método de extracción, características que son fundamentales a la hora de realizar la validación de un método, además de permitirnos analizar cuál es el efecto de los componentes acompañantes del analito en la matriz, aunque en realidad sólo pueden detectarse los errores sistemáticos y no las interferencias.

A la hora de preparar los reforzados se ha realizado una corrección con el fin de mantener la misma relación matriz- acetonitrilo para que sea exactamente la misma que en las muestras. La relación matriz-acetonitrilo en las muestras era de 1.5 g- 1.0 mL, ya que los extractos del blanco fueron preparados con 15 g, más la adición de 200 µl a 1 ml del extracto, el volumen final sería 1.2 ml, y la relación sería 1.5 g- 1.2 mL. Por tanto, los reforzados empleados para los estudios de recuperación se prepararon añadiendo los volúmenes adecuados de la solución stock a 18 g de matriz de blanco antes proceder a la adición de acetonitrilo. Así que, al extraer, corregimos la dilución del extracto cuando agregamos el volumen del patrón de calibración, y la relación es de 1.8 g-1.2 ml, que es equivalente a 1.5 g-1.0 ml. Cada muestra adicionada se homogeneizó y se dejó reposar durante 30 minutos antes de la extracción, procediéndose de la misma manera que para la preparación de muestras. De esta manera conseguimos que el blanco tenga la misma concentración de estándar interno que las muestras y los estándares de calibración. Al diluir la muestra de esta manera, la concentración estándar interna y la relación de matriz permanecen constantes. Una vez introducidas las alícuotas de los extractos en viales de 1,5 ml, fueron colocadas en el muestreador automático y se optimizaron las condiciones cromatográficas para el GC-MS/MS, siendo:

- Volumen de inyección de 6 µl y velocidad de inyección: 1 µl/s.

- T^a Inicial inyector: 79 °C. mantenida durante 1 min. en modo split con ratio 50:1 para eliminar el disolvente con la mínima pérdida de muestra. Se conecta el modo splitless y el inyector se calienta a 300 °C con un gradiente de 150 °C/min. Llegada esta temperatura se mantiene constante 10 min, para enfriarse de nuevo a 79 °C. Al minuto 3 después de la inyección se vuelve a conectar el modo split con un ratio 50:1 para limpiar el inyector y bajar la línea de base de la señal.
- Gas portador: helio en modo flujo constante 1.0 mL/ min.
- Programa de temperaturas del horno es el indicado en la Figura 26.



Figura 26. Programa de temperaturas del horno para el cromatógrafo de gases.

- Tiempo de análisis: 30.90 min.

Las condiciones de la espectrometría de masas se optimizaron de forma individual para cada analito con el fin de conseguir la sensibilidad máxima en el modo de control de la reacción seleccionada (SRM) en el triple cuadrupolo y fueron monitorizadas dos reacciones. La primera para la cuantificación y la segunda para la confirmación. El empleo del método SRM nos permite introducir un mayor número de pesticidas dentro de un mismo segmento. En el anexo 1 podemos ver las condiciones experimentales para el espectrómetro de masas y las condiciones individuales para el análisis SRM. Con el fin de obtener suficientes puntos de muestreo para cada pico y unos tiempos de permanencia adecuados para una buena sensibilidad, el método se dividió en 14 segmentos.

Otros parámetros considerados fueron: el ancho de pico seleccionado (1.5 uma para cuadrupolo 1 y 2.0 uma para cuadrupolo 3), la temperatura de la línea de transferencia (290 °C), la temperatura fuente de iones (250 °C), la temperatura múltiple (40 °C), los tiempos de escaneo para cada segmento (entre 0.8 y 1.0 s, con un máximo de 35 transiciones por

segmento), el voltaje del multiplicador de electrones (+300 V), y otras operaciones (cambio del liner cada cincuenta muestras realizándose un ajuste automático semanalmente).

La validación es un término que se asocia a la validación de métodos según ISO 17025:2005, la cual consiste en “La confirmación a través de examen y el aporte de evidencias objetivas, de que cumplan los requisitos parciales para un uso específico previsto” (Sagrado S. et al., 2005). Algunos de estos requisitos, además del LDD, la robustez y la selectividad, son los que vienen en la Tabla 12.

Tabla 12. Requisitos y criterios de validación (Sagrado S. et al., 2005).

Requisitos de validación	Criterios
Rango: referido al intervalo de concentraciones de analito validado.	- Debe incluir el LMR para cada analito en cada matriz
Linealidad: referido al comportamiento de los datos dentro del rango de concentración del analito.	- Coeficiente de correlación (R^2) debe ser igual o mayor a 0.990. - Desviación estándar relativa del factor de respuesta para cada punto de calibración $\leq 20\%$. - Intervalo de trabajo lineal (exactitud y precisión aceptables).
Precisión: representa la proximidad entre datos o resultados bajo condiciones iguales.	- Se expresa como reproducibilidad (precisión entre días). - Debe ser $\leq 20\%$.
Veracidad: capacidad del método para determinar / extraer la totalidad del analito de forma particular.	- La recuperación viene expresada como recuperación media, debe estar en el rango de 70-120 %
Límite de cuantificación (LDC): representa la concentración de analito más baja que puede determinarse con una repetibilidad y exactitud aceptable	- Debe ser inferior o igual al LMR más bajo y debe cumplir con los requisitos de precisión y veracidad.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para llevar a cabo un buen análisis de los resultados, subdividiremos el presente en función de cuatro objetivos: (1) Desarrollo del método de GC-MS/MS, (2) Estimación de los límites de cuantificación, (3) Rendimiento analítico y (4) Validación del método.

5.1. Desarrollo del método de GC/MS-MS.

A la hora de crear un buen método analítico lo primero que hemos de hacer es optimizar la energía de colisión (CE) y la presión del gas de colisión. Tras esto se optimiza el método de detección del MS/MS inyectando de manera individual en modo SCAN cada uno de los pesticidas de interés con el fin de poder obtener su tiempo de retención y encontrar el ion precursor óptimo que, por lo general, será el de mayor intensidad (mayor relación m/z).

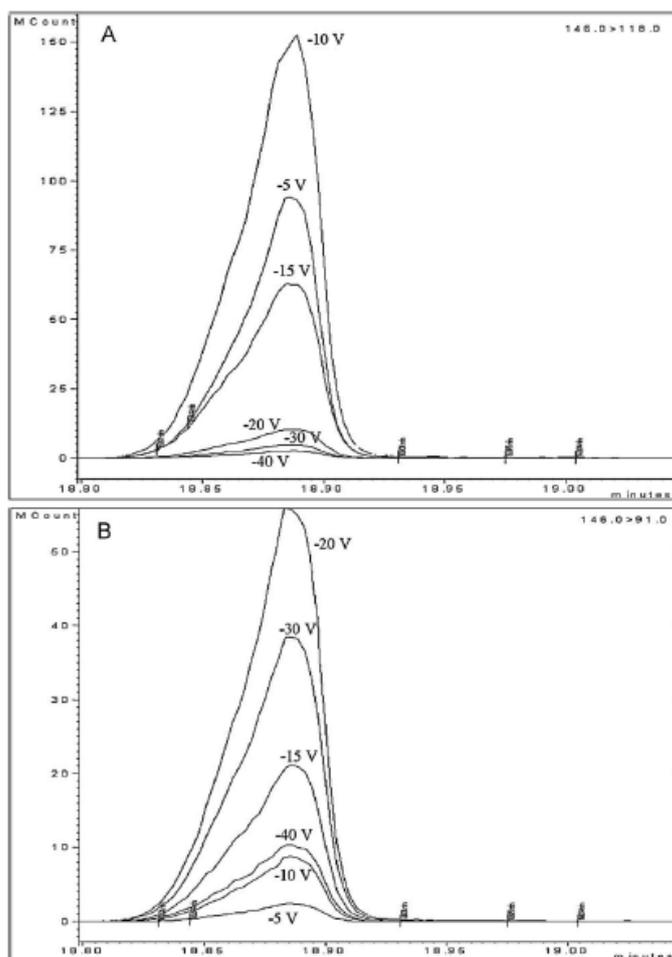


Figura 27. Ejemplo del efecto de energía de colisión para el Quinalfos. A) Transición 146.0-118.0

B) Transición 146.0-91.0 (Camino, F. J. et al, 2011)

Tras haber obtenido los iones precursores y los correspondientes tiempos de retención, se crearon distintos métodos en modo SCAN, los cuales incluían aproximadamente 30 pesticidas que se procedió a analizarlos de manera conjunta, con un rango de energía de colisión de 5-40 V con un gradiente de 5 V. En la Figura 27, tenemos los efectos de la energía de colisión sobre el Quinalfos. Con los resultados obtenidos, se seleccionó el ion cuantificador (mayor intensidad) y el ion calificador (segundo de mayor intensidad).

Una vez identificados, el cualificador y el cuantificador, se creó un método en modo SRM el cual permitió introducir un mayor número de pesticidas dentro de cada segmento, y se optimizó la presión del gas de colisión inyectando el vial de la muestra a diferentes presiones de argón (rango de 1.0 a 2.0 mTorr con incrementos de 0.1 mTorr). De este modo se pudo seleccionar como óptima la presión de 1.5 mTorr, presión en la cual la mayoría de pesticidas daban respuestas altas. Por último, la nueva energía de colisión fue empleada en modo SRM no observando diferencias significativas respecto al modo SCAN. Tras ajustar los segmentos, los tiempos de permanencia (dwell) se aumentaron para los analitos menos sensibles y se redujo para analitos con suficiente señal. En la Figura 28, tenemos los cromatogramas en modo SCAN y modo SRM para una muestra de tomate contaminada.

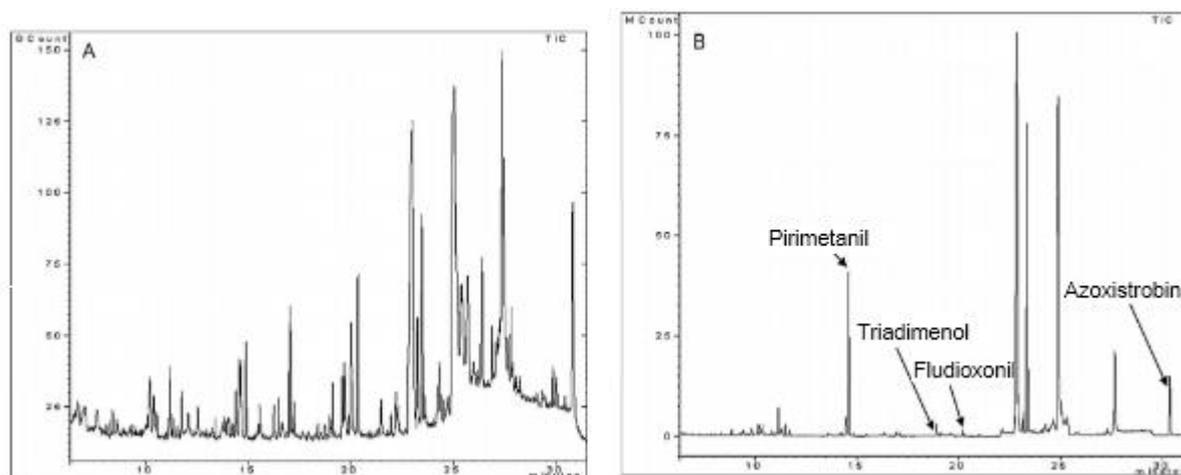


Figura 28. Cromatograma de una muestra de tomate contaminada (A) modo SCAN (B) modo SRM (Camino F.J. et al., 2011)

Se probaron tres flujos de gas portador:

- Flujo de 0.8 mL/min: daba buena resolución y el número de segmentos era aceptable.
- Flujo de 1.0 mL/min: daba una buena resolución y se consideró el óptimo, porque permitía tiempos de análisis más cortos.

-Flujo de 1.2 ml/min: era posible dividir el método en 10 segmentos, algunos de los cuales incluían demasiadas transiciones y los tiempos de escaneo eran demasiado largos (más de 1 s).

Para evaporar el disolvente que acompaña a los analitos, se consideró óptimo un ratio de split 50:1, ya que permitió una correcta evaporación del disolvente con la mínima pérdida de analitos de mayor volatilidad.

Se estudiaron diferentes volúmenes de inyección, dentro del rango 2-10 μ l, observándose que un volumen de 6 μ l era el óptimo. Con este volumen se introduce una cantidad menor de matriz en el detector, sin pérdida importante de sensibilidad. No se aconseja emplear volúmenes mayores, ya que el acetonitrilo tiene un punto de ebullición relativamente alto y una alta expansión de vapor.

5.2. Estimación de los límites de cuantificación.

El límite de cuantificación (LDC), representaba la concentración de analito más baja que puede determinarse con una repetibilidad y exactitud aceptable. Debe ser inferior o igual al LMR más bajo y debe cumplir con los requisitos de precisión y veracidad. Por tanto, atendiendo a esto se estableció como criterio para la estimación del límite de cuantificación una relación señal / ruido mínima de 10 para las transiciones de menor intensidad. El ion calificador cumplía con este requisito para todos los casos. Se adoptó, por tanto, como LDC el valor de concentración que cumplía con esta relación señal ruido, estableciéndose el valor de 10 μ g/Kg (0.01 mg/kg), cumpliendo lo que señala el Reglamento Europeo n^o 396/2005, el cual establece los LMR para las distintas materias activas. Así mismo, los LDC fueron validados según los requisitos de exactitud y reproducibilidad, pudiéndose cuantificar e identificar con precisión. Este LDC es la mínima concentración que se ha demostrado que puede ser cuantificada con nuestro método, siendo válido para todas las sustancias. No resultó interesante evaluar el límite de detección, el cual representa el mínimo valor detectable de analito, no necesariamente cuantificable por el método. Sin embargo, se estimó que debía encontrarse entre 0.001 y 0.003 mg/Kg (criterio S/N=3).

5.3. Rendimiento analítico.

Según quedó descrito en el apartado 4.6.2 de este documento, se prepararon curvas de calibración con cinco puntos en disolvente y con los extractos del blanco de las nueve matrices de ensayo (tomate, pimiento, lechuga, pepino, berenjena, calabacín, melón, sandía y manzana). Se empleó la prueba de la t-Student y se estudió la linealidad de los gráficos de calibración de acuerdo con el Comité del Codex sobre Métodos Analíticos y toma de muestras (1994) de la Comisión del Codex. La intersección (a), la pendiente (b), el coeficiente de correlación (R^2) y la desviación estándar relativa (RSD) de los factores de respuesta fueron establecidos según vienen reflejados en el anexo 2.

Se realizó una prueba de falta de ajuste empleando varias réplicas (múltiples observaciones con valores de X idénticos). Las réplicas representan el "error puro", porque solo la variación aleatoria puede causar diferencias entre los valores de respuesta observados. Para determinar si el modelo se ajusta a los datos con exactitud, debe compararse el valor P_{lof} (en inglés, "*p-value for lack-of-fit*"), calculado como $1 - P(F \leq f_j)$, donde $P(F \leq f_j)$ es la función acumulada para la distribución F, f_j estadístico F para la prueba, con el nivel de significación. Por lo general, un nivel de significación (también conocido α) de 0.05 funciona adecuadamente. Un α de 0.05 significa que la probabilidad de concluir que el modelo no se ajusta los datos cuando realmente lo hace es de solo 5%.

Valor $p < \alpha$: el modelo no se ajusta a los datos con exactitud. Para obtener un mejor modelo, es posible que tenga que agregar términos o transformar los datos.

Valor $p > \alpha$: no se puede concluir que el modelo no se ajusta adecuadamente a los datos.

De este modo, la prueba de falta de ajuste se aplicó a dos duplicados, realizándose dos inyecciones de cada estándar, obteniéndose una $P_{lof} > 5\%$ en todos los casos, concluyéndose, por tanto, que no hay evidencias de que el modelo no se ajusta a los datos.

El primer estándar de la calibración tenía una concentración inferior al 40% del LDC, por lo que es posible calcular con precisión concentraciones cercanas al LDC, siempre que las recuperaciones estén en un rango 60-100%. Para los análisis de rutina no es necesario aplicar este paso. Se estableció un rango lineal de 6 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para todos los casos.

Para estimar el efecto matriz se prepararon diez curvas de calibración, una con disolvente y otras nueve con las diferentes matrices. Se aplicó la prueba t de Student para evaluar el efecto

de matriz. Esta prueba verifica la similitud entre los valores de la pendiente para cada curva de calibración obtenida. Dependiendo de la disminución / incremento en el porcentaje de la pendiente, podría clasificarse el efecto matriz en distintos grados:

- Leve: pérdidas o mejoras de señal de entre 20% - 0%.
- Medio: pérdidas o mejoras de señal entre 50% -20%.
- Fuerte: pérdidas o mejoras de señal > 50%.

Primero se necesita comparar los valores de varianzas estimadas expresado como $S^2_{y/x}$ por medio del test F de Snedecor. Los resultados del presente estudio mostraron que todos los pesticidas presentaron coeficientes de correlación (R^2) superiores al 99%. En todas las matrices, para el 75 % de los pesticidas contenidos en ellas, la disminución de la señal fue muy baja (entre 0 y - 20%) en relación con la de la curva de calibración con disolvente. Cabe destacar, que para algunos compuestos se observó una fuerte reducción de la señal, que fue equivalente entre las distintas matrices. Todo esto demuestra que las curvas de calibrado deben de ser preparadas con los extractos de matriz.

Además, se desarrolló un estudio inter-matricial para comparar los datos obtenidos en la cuantificación de muestras naturales utilizando curvas de calibrado de diferentes matrices. No se observaron diferencias estadísticas entre los datos obtenidos, así que se tomó la matriz del tomate como la adecuada para establecer la calibración estándar de matriz para llevar a cabo la validación. En el anexo 2 se muestran los parámetros de calibración obtenidos. La interceptación de las curvas de calibración fue nula en todos los casos (desde 0 a 1.5×10^{-18}).

5.4. Validación del método.

Recordemos que el término de validación en multitud de ocasiones es substituido por el de verificación, y generalmente, la validación es un término que se asocia a la validación de métodos según ISO 17025, la cual consiste en “La confirmación a través de examen y el aporte de evidencias objetivas, de que cumplan los requisitos parciales para un uso específico previsto” (Sagrado S. et al., 2005).

El método que estamos describiendo fue validado para matrices de frutas y vegetales con alto contenido de agua y bajo contenido de grasa (con alto y bajo contenido de azúcar). Las nueve matrices fueron validadas usando tomate como referencia. El protocolo del método de

validación fue diseñado para obtener la acreditación oficial según la norma ISO UNE-EN ISO / IEC 17025: 2005 de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). La validación nos va a permitir estimar la incertidumbre de los resultados de todo ensayo desarrollado en el laboratorio, y nos dará la seguridad de que el procedimiento que estamos siguiendo es fiable, es decir, nos aporta resultados exactos y precisos. Las características que se validan dependen del tipo de ensayo, evaluándose en este estudio las siguientes:

- Precisión y exactitud: se evaluaron 2 niveles, el LDC y 10xLDC, para cada matriz. Se analizaron 5 muestras en cada nivel en diferentes días para distintas matrices. Se estimó la precisión como RSD (%) siendo menor que 20% para todos los analitos. La precisión se calculó en términos de recuperación. Las recuperaciones estuvieron en el rango 85- 115%, para ambos niveles.
- La linealidad fue evaluada con cinco puntos de calibración (0.6, 1, 2, 6 y 10 veces el LDC) usando la calibración estándar de matriz coincidente (descrito en 4.6.2). Se utilizó la regresión de mínimos cuadrados en todos los casos, trazando la concentración versus área analito/área ISTD, tal y como podemos ver en la Figura 29. Se obtuvieron $R^2 > 99.0\%$ y el RDS (%) < 15%. El $P_{lof} > 5\%$ para todos los casos.

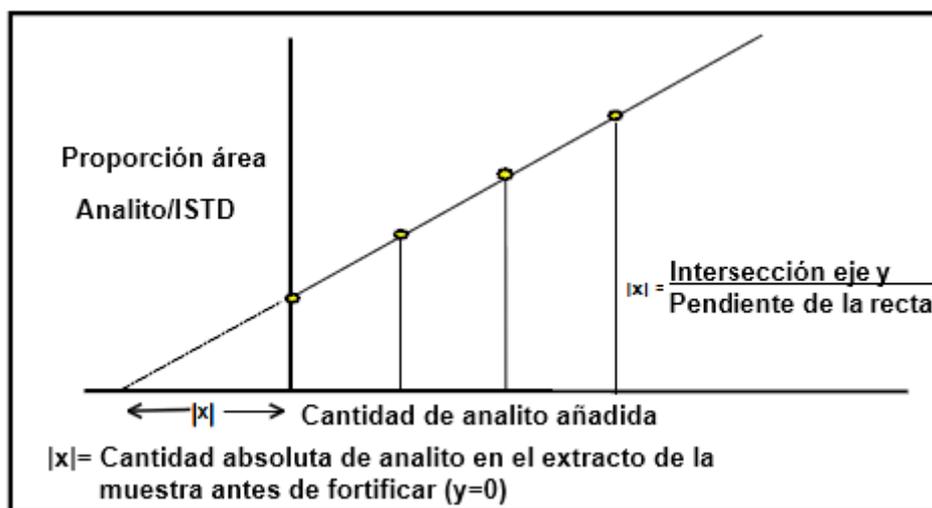


Figura 29. Calibración interna empleando el método de adiciones estándar

- Incertidumbre calculada según las indicaciones de EURACHEM según el documento "Guía para la expresión de incertidumbre en la medición" (EURACHEM / CITAC Guide CG4, 2000- versión en español 2012). La incertidumbre se calculó individualmente para cada plaguicida, y varió entre 18% y 46%, con un promedio de 27%, cumpliendo de esta manera el requisito europeo de un máximo incertidumbre del 50%. En el anexo

3 se muestran las incertidumbres calculadas para todos los pesticidas en la matriz de tomate.

- La identificación de los compuestos se hizo de acuerdo con los tiempos de retención relativos (RRT, es el ratio del tiempo de retención del analito con el del estándar interno), con un error máximo de 0.5% con respecto al RRT de los estándares de calibración según indica el documento SANCO / 10684/2009 (2010). La confirmación de los analitos se realizó calculando la relación entre la intensidad del ion de cuantificación y la intensidad del ion de confirmación y se comparó el valor obtenido con la relación de iones para el estándar con el valor más cercano en concentración. Las tolerancias permitidas se establecieron en función de la intensidad relativa entre ambos iones, siendo:
 - Intensidad relativa > 50%, se acepta una tolerancia del $\pm 20\%$.
 - Intensidad relativa entre 20-50%, se acepta una tolerancia del $\pm 25\%$.
 - Intensidad relativa entre 10-20%, se acepta una tolerancia del $\pm 30\%$.
 - Intensidad relativa $\leq 10\%$, se acepta una tolerancia del $\pm 50\%$,

Mediante este método con un ion precursor y dos iones producto monitorizados (transiciones MS/MS), se logran cuatro puntos de identificación según se establece en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE. En la figura 30, tenemos el ejemplo del espectro de masas del Quinalfos en modo SCAN y modo MS/MS. Todos los parámetros resultantes del proceso de la validación están presentados en el anexo 4.

Se realizaron ensayos interlaboratorio ciegos con muestras de manzana y lechuga, las cuales contenían diferentes concentraciones de pesticidas. En todos los casos para ambas matrices, se obtuvieron valores de Z_{score} dentro del intervalo de aceptación (-2, +2). El cálculo de $Z_{score(i)}$ para cada laboratorio / pesticida se calcula del siguiente modo:

$Z_{score(i)} = (x_i - x_i^*) / FFP-s_i$; donde x_i es el valor que aporta cada laboratorio, x_i^* es el valor asignado y $FFP-s_i$ es la desviación estándar para cada pesticida (i). El valor de $FFP-s_i$ se calcula como: $FFP-s_i = b * x_i^*$, con $b = 0.25$ (25% FFP-RSD). El valor de 25% es aproximado y se basa en la experiencia de anteriores interlaboratorios. FFP-RSD es la desviación estándar relativa adecuada para el propósito, que se denomina en inglés, "*Fit-For-Purpose Relative Estándar Deviation*". En los métodos multiresiduos se aceptan hasta objetivos de incertidumbre del 50%. Así que se considerará que:

Si $|z| \leq 2$ (satisfactorio); Si $2 < |z| < 3$ (discutible, cuestionable); Si $|z| \geq 3$ (insatisfactorio).

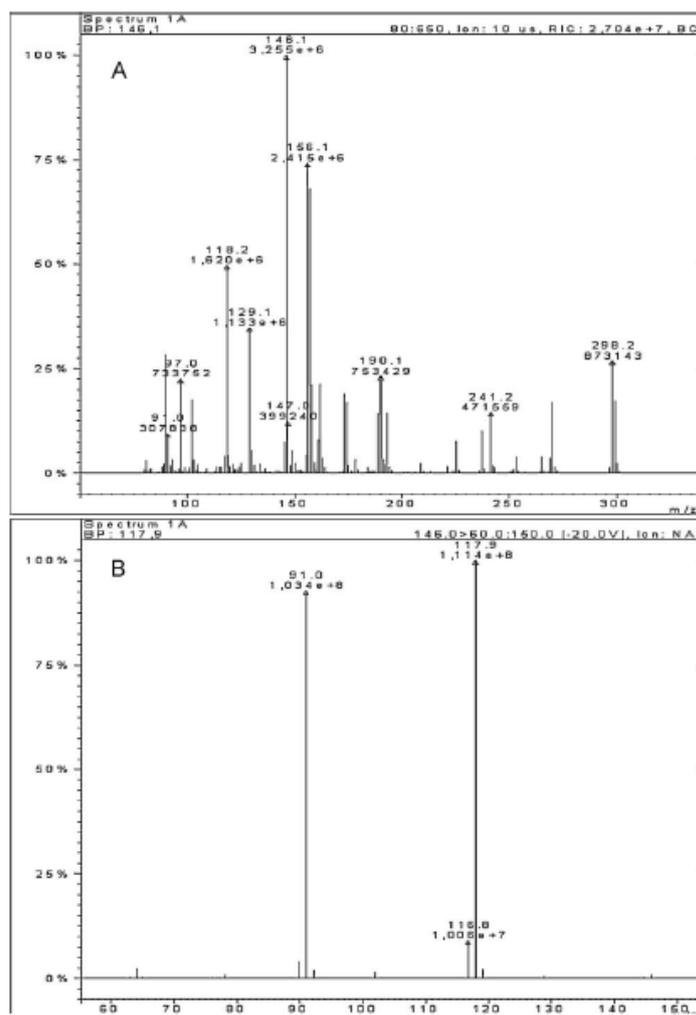


Figura 30. Ejemplo de un espectro de masas para el Quinalos. A) Modo SCAN B) Modo MS/MS (Camino F. J. et al., 2011)

Tras la validación del método QuEChERS acoplado a GC-MS/MS, se consiguió su incorporación en los laboratorios de rutina, considerándose una potente herramienta hoy día. No obstante, deben realizarse controles de calidad interna para asegurar la calidad de los resultados. Cada secuencia de muestras debe ir acompañada de su curva de calibrado sobre matriz, de un reforzado de concentración igual al LDC, y su valor debe estar entre el 80-120%. Así mismo tras cada lote, se inyecta un punto de la calibración con el fin de verificar que la respuesta del instrumento es constante admitiéndose un error de 25%. Esto mismo es lo que se pudo realizar con este método en un breve espacio de tiempo. Se realizaron 1463 análisis de muestras entre las que había tomate, pimienta, lechuga, pepino, berenjena, calabacín, melón, sandía y manzana, obteniéndose al menos en 689 muestras un 47.7% de positivos en algunos de los pesticidas estudiados. En el anexo 5, tenemos un resumen de los resultados obtenidos para cada matriz y pesticidas (% positivos, máximo y mínimo encontrados, etc.).

6. CONCLUSIONES.

Con el objetivo de garantizar la Salud Pública, son cuantiosos los métodos de extracción que han sido desarrollados durante años (Luke, Mills, etc.) siendo cada vez más selectivos, capaces de separar eficazmente determinados analitos del resto de interferentes de la matriz, para así obtener unos resultados más fiables. No obstante, esta metodología convencional está quedando en un segundo plano, consecuencia de su elevado coste, tanto económico como medioambiental, como por la complejidad de la misma en muchos casos.

Con el método QuEChERS, los laboratorios de rutina disponen de un método rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro, para llevar a cabo un análisis multiresiduos en diferentes matrices. Se requiere de poca cantidad de disolventes, siendo más respetuosos con el medio ambiente que con los métodos convencionales al generar menos residuos, y es mucho menos laborioso.

Este método asociado a la GC-MS/MS con triple cuadrupolo (QQQ) son una herramienta muy potente para cuantificar y confirmar un amplio espectro de pesticidas con propiedades muy diversas de manera precisa y fiable. El triple cuadrupolo aporta una gran sensibilidad y selectividad, y elimina gran cantidad de las interferencias de la matriz a diferencia de los sistemas de simple cuadrupolo (MSD). Es vital la optimización de forma individualizada de cada uno de los pesticidas de modo que se consigue una máxima sensibilidad empleando el modo de control de la reacción seleccionada. En el trabajo estudiado se establecieron unos tiempos de exploración para cada uno de los segmentos entre 0.8-1.0 s, con un máximo de 35 transiciones por segmento. El proceso de separación es relativamente corto, en este caso llevó 30.9 s. Con muy poco tiempo es posible determinar un elevado número de plaguicidas.

Para evaluar un método analítico, cada secuencia de muestras deber ir acompañada de su curva de calibración sobre matriz, siendo el método de adiciones estándar recomendable para estudiar el efecto matriz, el cual proporcionará errores sistemáticos proporcionales (se empleó un rango de la curva 0.006 mg kg⁻¹- 0.1 mg kg⁻¹). Se estableció un LDC de 0.01 mg kg⁻¹, estimándose un LDD de 0.006 mg kg⁻¹, que es más que suficiente para cumplir con las exigencias legislativas de los LMR. Además, se requiere de la inyección de reforzados, obteniéndose valores de recuperación dentro del rango 70-120% con un %RSD ≤ 20%.

Los volúmenes de inyección suelen ser pequeños, en el caso del estudio del tomate se inyectaron 6 μ l, debido al elevado volumen de expansión del acetonitrilo. No obstante, en la bibliografía hay métodos donde se emplean volúmenes dentro del rango 1-10 μ l con otros disolventes.

La versatilidad del método QuEChERS queda demostrada con la cuantiosa bibliografía encontrada sobre el mismo, en el que se introducen pequeños cambios, especialmente en la fase del Clean-up, ampliando su uso a otras matrices diferentes a las que se había destinado el método original. El uso de adsorbentes como el C18 para la eliminación de las grasas o el GCB para la eliminación de pigmentos es bastante frecuente, dando buenos valores de recuperación. Hay estudios en los que se demuestra que una combinación de PSA/GCB/C18 da mejores resultados que con el PSA como único adsorbente. Son también frecuentes la utilización de otros disolventes de extracción como el acetato de etilo, metanol, acetona, aunque las recuperaciones en acetonitrilo son más favorables.

Existen también estudios con diferentes membranas de filtración que han dado muy buenos resultados, en diferentes matrices complejas por su alto contenido en clorofilas u otro tipo de interferentes en la matriz, como es el caso de las espinacas, pero dan valores de recuperación algo menores a los obtenidos por el QuEChERS (Jong J. et al. 2016).

7. BIBLIOGRAFÍA.

Amelin V.G.; Lavrukina O.I. Food Safety Assurance Using Methods of Chemical Analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, **2017**, 72, N° 1, 1–46.

Analytical Methods Committee. Is my calibration linear? *Analyst*. **1994**, 119, 2363-2366.

Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck. F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 412-431

Barberá, C. Pesticidas agrícolas; Editorial Omega; 1989. 604pp.

Barker S.A. Matrix solid phase dispersion (MSPD) *J. Biochem. Biophys. Methods*. **2007**, 70, 151–162

Boletín Oficial del Estado- <https://www.boe.es> (accessed May 15, 2018).

Bouaid A. Nuevos tratamientos de muestra para la preconcentración, estabilización y determinación de pesticidas por cromatografía de gases. Tesis. Madrid. 2001; pp 2-102.

Camino- F.J; Zafra A.; Ruiz J.; Bermúdez R.; Ballesteros O.; Navalón A.; Vílchez J. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2011**, 24, 427-440

Cavallo A. Plaguicidas: qué son y cómo usarlos; SIMA Ed. Córdoba. Argentina, 2006; 189 pp.

Codex Alimentarius: http://www.codex_alimentarius.net (accessed June 10, 2018).

Columé, A.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M. “Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroids pesticides”. *Analytica Chimica Acta*. **2001**, 436, 153-162.

Coscollá R. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. 1ª Edición. Ed. Mundi- Prensa. Madrid. España, 2001; 205 pp.

Coscollá R.; Coscollá. C. Cómo disminuir o eliminar los residuos de plaguicidas en frutas, hortalizas y alimentos transformados. Ed. Phytoma-España. 2006; 231 pp.

Comisión del Codex Alimentario. Manual de procedimiento. Decimonovena edición. Publicado por la Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma. 2010.

EU-Pesticides database- European Commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (accessed June 10, 2018).

EUR-Lex: <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html?locale=es> (accessed May 30, 2018).

EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides: http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl article.asp?LabID=500&CntID=828&Theme_ID=1&Pdf=False&Lang=EN (accessed July 7, 2018).

Fenik. J.; Tankiewicz.M.; Biziuk. M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*. **2011**, 30, 814-826.

Frehse H. and Hans-Friedrich W. 1994. The behaviour of pesticides residues in fruits and vegetables: Evaluation by decline curves. En: III Seminario Internacional sobre residuos de plaguicidas. Almería. España. Noviembre 2003.

González M.Á.; Socas B.; Herrera A.V.; González J.; Hernandez J.; Rodriguez M.Á. Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*. **2015**, 71, 169–185.

Grande A.; Arrebola F. J.; Martínez J. L.; Hernández M. E.; Garrido A. Optimization and Validation of a Multiresidue Pesticide Method in Rice and Wheat Flour by Modified QuEChERS and GC-MS/MS. *Food Anal. Methods*. **2016**, 9, 548–563

Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. Ed. European Commission. 2017; 46 pp.

Guía CG 4 EURACHEM / CITAC. Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas. Tercera Edición Inglesa. Primera Edición Española. QUAM:2012.P1-ES

He Z.; Wang Y.; Wang L.; Peng Y.; Wang W.; Liu X. Determination of 255 pesticides in edible vegetable oils using QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*. **2017**, 409, 1017–1030.

Hong J.; Kawashima A.; Okamoto M.; Kanetsuki K.; Makino T. Fundamental study of a novel membrane filtration cleanup method for pesticide analysis in agricultural products. *Food Control*. **2016**, 64, 1-9.

Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J. "Overview of analytical technologies available to regulatory laboratories for determination of pesticide residues". *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. John Wiley & Sons Ltd. U. S. A. 2003.

Lehotay S.J; Sonb K.A; Kwonb H.; Koesukwiwat U.; Fud.W; Mastovskaan K.; Hoha E.; Leepipatpiboonc N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*. **2010**, 1217, 2548–2560.

Li J.; Liu D.; Wu T.; Zhao W.; Zhou Z.; Wang P. A simplified procedure for the determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in edible vegetable oils. *Food Chem*.

2014, 151, 47–52.

Li P.; Duan Y.; Ge H.; Zhang Y.; Wu X. Multiresidue Analysis of 113 Pesticides in Different Maturity Levels of Mangoes Using an Optimized QuEChERS Method with GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS. *Food Anal. Methods*. **2018**. Published on-line. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1263-5>

Lin, XY.; Mou, RX.; Cao, ZY.; Cao ZZ.; Chen MX. Analysis of pyrethroid pesticides in Chinese vegetables and fruits by GC–MS/MS. *Chemical Papers*. **2018**, 1-10.

Liu H.; Guo B.; Wang H.; Li J.; Zheng L. Determination of Bromothalonil Residues and Degradation in Apple and Soil by QuEChERS and GC–MS/MS *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. **2014**, 92, 451–454.

Lozano A.; Kiedrowska B.; Scholten. J.; Kroon M.; Kok A.; Fernández A.R. Miniaturization and optimization of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Food Chem*. **2016**, 192, 668–681.

Machado I.; Gérez N.; Pistón M.; Heinzen H.; Cesio M.V. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS/MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure. *Food Chem*. **2017**, 227, 227-236.

Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación- <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (accessed April 20, 2018).

Moors M.; Massart D.L.; McDowall R.P. Analyte isolation by solid phase extraction (SPE) on silica-bonded phases. Classification and Recommended Practices. *Pure Appl. Chem.*, **1994**, 66, 277-304.

Novo R.; Cavallo A.; Cragolini C.; Nobile R.; Bracamonte E.; Conles M.; Ruosi G. Y.; Viglianco A. Protección Vegetal. 4º edición. Ed. SIMA. Córdoba. Argentina. 2011; 492 pp.

Ortiz, F. Aplicación de plaguicidas. Nivel Cualificado. Manual y Ejercicios. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 2004; 237 pp.

Pesticide Analytical Manual Volume I. Multiresidue methods. FDA. 3ª Ed. 1994.

Ramirez L.; Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases espectrometría de masa /masa (GC-MS/MS). 2009; 92 pp.

Report the 1st Comprehensive CRL Survey for Pesticide Residue Laboratories in Europe. (November 2006- February 2007) Prepared by the CRL-SRM. Revision date: September 2007.

Rostad C.E.; Pereira W.E.; Leiker T.J. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **1989**, 18, 820.

Rouessac F.; Rouessac. A.; Análisis químico. "Método y técnicas instrumentales modernas". Editorial Mc. Graw Hill. 2003. 464 pp.

Sagrado S.; Medina M.J.; Donet E.; Martín Y.; Manual práctico de calidad en los laboratorios. Enfoque ISO 17025, 2ª edición. AENOR Ediciones. 2005. 377pp.

Stan H.J., Kellner G.; Confirmation of organophosphorus pesticide residues in food applying gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and pulsed positive negative detection. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **1989**, 18, 645.

Sherwood Fritz J.; Analytical solid-phase extraction. Editorial: Wiley-Vch. 1999.

Storch De Gracia. J.M; Fundamentos de la cromatografía de gases. 2ª Edición. Editorial Alhambra. 1975. 209 pp.

Strada, J. Evaluación del nivel de residuos de plaguicidas en granos de cereales y oleaginosas aplicados en el campo y en almacenamiento en la región central de Argentina. Tesis para optar al Grado Académico de Doctora en Ciencias Agropecuarias. Córdoba. 2014; 249 pp.

Uclés S.; Belmonte N.; Mezcua M.; Martínez A.B.; Marínez M.J.; Gamón M.; Fernandez A.R.; Validation of a multiclass multiresidue method and monitoring results for 210 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B.* **2014**, 49, 557–568

Uclés S.; Lozano A.; Sosa A.; Parrilla Vázquez P.; Valverde A; Fernández-Alba A.R.; Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta.* **2017**, 174, 72–81

Walorczyk S.; Validation and use of QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. *Talanta.* **2014**, 120, 106-113.

Wu CC.; Multiresidue method for the determination of pesticides in Oolong tea using QuEChERS by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2017**, 229, 580–587.

Anexo 1. Parámetros espectrometría de masas para la determinación de pesticidas seleccionados por GC-MS/MS.

Compuesto	t _R	Precursor (m/z)	Productos (m/z) (CE/eV)	Segmento	Tiempo de permanencia (ms)
Diclorvos	7.2	185	93 (20), 109 (15)	1	30, 30
Triclorfón	7.2	185	93 (20), 79 (25)	1	30, 30
Mevinfos	8.7	192	127 (10), 164 (10)	1	30, 30
Etridiazol	9.0	211	140 (25), 183 (10)	1	30, 30
o-fenilfenol	9.9	169	115 (25), 141 (15)	1	20, 20
Carbaril	9.9	115, 144	89 (20), 115 (25)	1	30, 30
Heptenofos	10.4	124	89 (10), 63 (25)	1	30, 30
Propoxur	10.9	152	92 (25), 109 (30)	2	37, 37
Etoprofos	11.2	158	97 (20), 114 (10)	2	37, 37
Trifluralina	11.5	306	158 (20), 264 (5)	2	37, 37
Cloroprofam	11.6	213	171 (10), 127 (15)	2	37, 37
Benfluralina	11.6	292	206 (10), 264 (5)	2	37, 37
Sulfotep	11.7	322	146 (10), 266 (10)	2	37, 37
Tiometón	12.4	158, 125	125 (10), 79 (10)	2	37, 37
Diclorán	12.6	206, 176	176(10), 148 (10)	2	37, 37
Simacina	12.8	201	173 (5), 186 (5)	2	37, 37
Atrazina	12.9	200	104 (20), 122 (10)	2	37, 37
Lindano	13.1	181, 219	145 (20), 183 (5)	3	41, 41
Terbutilacina	13.4	214, 229	132 (10), 173 (10)	3	41, 41
Diazinón	13.4	179	121 (45), 137 (30)	3	41, 41
Pirimetanil	13.6	198, 199	118 (30), 183 (25)	3	30, 20
Disulfotón	13.7	274, 186	88 (10), 97 (10)	3	41, 41
Etrimfos	13.8	292	153 (15), 181 (10)	3	41, 41
Pirimicarb	14.1	238	96 (25), 166 (15)	3	41, 41
Etiofencarb	14.4	168, 107	10 (5), 77 (15)	3	41, 41
Chlorpirifos	14.7	286	208 (10), 241 (25)	4	58, 58
Metribucina	14.8	198	82 (20), 110 (10)	4	58, 58
Vinclozolina	14.9	285	178 (20), 212 (10)	4	58, 58
Clorotalonil	15.0	266	170 (20), 231 (20)	4	58, 58
Paratión-metilo	15.0	263	109 (10), 153 (5)	4	41, 41
Tolclofos-metilo	15.0	250	185 (20), 220 (10)	4	58, 58
Heptacloro	15.1	272	143 (20), 237 (15)	4	58, 58
Metalaxilo	15.2	206	132 (10), 16 (25)	4	58, 58
Pirimifos	15.6	305	180 (20), 290 (10)	5	31, 31
Fenitrotión	15.7	277	125 (15), 260 (10)	5	31, 31
Malatión	16.0	173	99 (10), 127 (10)	5	31, 31
Chlorpirifos	16.1	314	258 (20), 286 (5)	5	31, 31
Aldrín	16.2	263	227 (20), 191 (40)	5	31, 31
Clortal -dimetilo	16.3	332	223 (40), 301 (10)	5	31, 31
Fentión	16.3	109	109 (10), 169 (15)	5	31, 31
Fenpropimorfo	16.3	128	110 (10), 70 (15)	5	31, 31
Paratión	16.4	291	109 (15), 137 (10)	5	31, 31
Triadimefón	16.5	208	111 (20), 181 (10)	5	31, 31
Tetraconazol	16.5	336	155 (30), 204 (30)	5	31, 31
Isocarbofos	16.6	136, 230	108 (20), 155 (20)	5	31, 31
Dicofol	16.6	139, 250	111 (15), 139 (30)	5	31, 31
Isofenfos- metilo	17.0	199, 231	121 (5), 121 (15)	6	31, 31
Pendimetalina	17.1	252	162 (20), 191 (10)	6	33, 33
Penconazol	17.3	248	157 (20), 192 (10)	6	33, 33
Heptacloro epóxido	17.4	353	216 (30), 282 (20)	6	33, 33
Isofenfos	17.4	255	121 (20), 213 (10)	6	33, 33
Fipronil	17.4	367	213 (20), 255 (20)	6	33, 33
Clorfenvinfos	17.5	267	123 (40), 159 (30)	6	33, 33
Mecarbam	17.5	329	116 (30), 131 (10)	6	33, 33
Fentoato	17.6	274, 246	109(20), 121(10)	6	33, 33
Quinalfos	17.6	146	91(25), 118(10)	6	33, 33
Furalaxilo	17.7	301	224(10), 168(40)	6	33, 33
Procimidona	17.8	283	96(10), 255(10)	6	33, 33
Triadimenol	17.8	168, 128	70(10), 100(10)	6	33, 33
Triflumizol	17.8	206, 278	179(15), 73(5)	6	33, 33
o,p0-DDE	18.2	318	210(30), 246(10)	7	60, 60

(Camino, F. J, et al., 2011)

Anexo 1. Continuación. Parámetros espectrometría de masas para la determinación de pesticidas seleccionados por GC-MS/MS.

Compuesto	t _R	Precursor (m/z)	Productos (m/z) (CE/eV)	Segmento	Tiempo de permanencia (ms)
Chinometionato	18.2	206, 234	148(10), 206(5)	7	60, 60
Paclobutrazol	18.3	236	125(30), 167(20)	7	60, 60
Endosulfán alfa	18.5	241	136(40), 170(30)	7	60, 60
Fenamifos	18.8	303	154(15), 195(10)	8	31, 31
Flutolanil	18.9	281, 173	173(5), 145(20)	8	20, 20
Hexaconazol	18.9	214	152(30), 172 (20)	8	31, 31
Protiofos	18.9	267, 309	221 (20), 239 (15)	8	31, 31
Dieldín	19.3	263, 279	193 (40), 209 (30)	8	31, 31
o,p0-DDD	19.4	235	165 (40), 199 (20)	8	31, 31
Buprofecina	19.4	172	115 (20), 131 (10)	8	31, 31
Miclobutanilo	19.4	179	125 (20), 152 (5)	8	31, 31
Flusilazol	19.4	233	165 (15), 152 (15)	8	31, 31
Oxifluorfen	19.4	361	252 (20), 300 (20)	8	31, 31
Bupirimato	19.4	273	107 (20), 193 (10)	8	31, 31
Cresoxim-metilo	19.5	206	162 (5), 132 (10)	8	31, 31
Clorfenapir	19.7	247	200 (25), 227 (15)	9	50, 50
Ciproconazol	19.9	222	125 (20), 153 (10)	9	40, 34
Endrín	19.9	263	193 (40), 228 (35)	9	40, 35
Fluazifop-butilo	19.9	383	254 (30), 282 (10)	9	40, 36
Endosulfán beta	20.3	241	136 830), 170 (20)	9	40, 37
Etión	20.4	231	185 (20), 203 (10)	9	40, 38
Oxadixil	20.5	163	117 (20), 132 (5)	9	40, 39
o,p0-DDT	20.5	235	165 (40), 199 (20)	9	40, 40
Fludioxonil	19.3	248	154(20), 183 (20)	10	20, 20
Benalaxilo	21.1	148	31 (30), 105 (20)	10	30, 30
Carbofenotión	21.3	199	97 (20), 143 (10)	10	30, 30
Trifloxistrobina	21.4	222, 190	130 (15), 130 (10)	10	30, 30
Endosulfan sulfato	21.5	272	237 (10), 141 (40)	10	30, 30
Propiconazol	21.6	259	191 (10), 173 (10)	10	30, 30
Nuarimol	22.0	139, 235	111 (20), 139 (15)	10	30, 30
Tebuconazol	22.0	250	139 (10), 125 (20)	10	30, 30
Diflufenican	22.2	266	246 (5), 238 (5)	10	30, 30
TPP (internal std)	22.2	326	233 (20)	10	30, 30
Iprodiona	22.9	314, 316	245 (10), 247 (10)	11	30, 30
Bifentrín	23.0	181	115 (50), 166 (20)	11	30, 30
Bromopropilato	23.1	341	155 (40), 185 (20)	11	30, 30
EPN	23.1	185	110 (30), 157 (10)	11	30, 30
Tetrametrín	23.2	164	107 (30), 135 (10)	11	30, 30
Fenpropatrín	23.4	265	210 (20), 89 (40)	11	30, 30
Furatiocarb	23.8	194	165 (10), 133 (20)	11	50, 50
Tetradifón	23.9	227	199 (20), 164 (30)	11	30, 30
Piriproxifén	24.4	226	186 (20), 109 810)	12	30, 30
Lambda-cihalotrín	24.7	181, 197	152 (25), 141 (25)	12	30, 30
Acrinatrina	25.0	181, 221	152 (25), 193 (20)	12	30, 30
Fenarimol	25.0	251	139 (10), 111 (30)	12	30, 30
Pirazofos	25.0	221	193 (10), 177 (20)	12	30, 30
Azinfos-etil	25.2	160	77 (20), 132 (10)	12	50, 50
Bitertanol	25.9	170	141 (20), 115 (30)	12	30, 30
Permetrín	26.2	183	153 (10), 115 (20)	12	30, 30
Piridaben	26.2	309	132 (30), 147 (20)	12	30, 30
Fenbuconazol	26.9	129, 198	102 (159), 130 (10)	13	50, 50
Cipermetrina	27.3	181, 163	152 (20), 127 (10)	13	50, 50
Flucitrinato	27.5	199	107 (25), 157 (10)	13	50, 50
Etofenprox	27.6	163	107 (25), 135 (5)	13	50, 50
Fenvalerato	28.2	167, 206	125 (5), 177 (20)	13	50, 50
Tau-fluvalinato	28.3	250	130 (40), 200 (20)	13	50, 50
Esfenvalerato	28.4	167, 206	125 (5), 177 (20)	14	70, 70
Difenoconazol	28.7	323	201 (50), 265 (20)	14	70, 70
Deltametrín	28.8	253	93 (10), 172 (5)	14	70, 70
Azoxistrobina	29.3	344	156 (40), 329 (10)	14	70, 70
Famoxadona	29.5	330	224 (5), 237 (5)	14	70, 70

(Camino, F. J, et al., 2011)

Anexo 2. Parámetros de calibración para la matriz de tomate.

Compuesto	b	R ²	RSD (%)	Compuesto	b	R ²	RSD (%)
Acinatrina	0.104	100	2	Furalaxilo	0.014	99.9	12
Aldrín	0.086	99.6	10	Furatiocarb	0.055	100	3
Atrazina	0.071	99.1	11	Heptaclo	0.022	99.9	5
Azinfos-etil	0.051	99.8	4	Heptaclo- epóxido	0.061	99.9	4
Azoxistrobina	0.138	100	1	Heptenofos	0.134	99.9	15
Benalaxilo	0.410	100	5	Hexaconazol	0.064	100	2
Benfluralín	0.070	100	8	Iprodiona	0.036	99.9	9
Bifentrín	0.652	100	3	Isocarbofos	0.182	99.8	5
Bitertanol	0.880	99.6	9	Isofenfos	0.241	99.9	6
Bromopropilato	0.420	100	1	Isofenfos-metilo	0.007	99.7	8
Bupirimato	0.200	100	5	Cresoxim -metilo	0.203	99.9	7
Buprofecina	0.090	99.8	6	Lindano	0.206	99.9	4
Carbaril	0.826	99.9	11	Malatión	0.102	100	4
Carbofenotión	0.090	100	4	Mecarbam	0.018	99.6	11
Lambda-Cihalotrín	0.411	99.8	7	Metaxilo	0.119	99.9	7
Cipermetrina	0.060	100	10	Metribucina	0.134	99.9	5
Ciproconazol	0.591	100	1	Mevinfos	0.035	99.9	6
Clorfenapir	0.029	99.8	5	Miclobutanilo	0.438	100	2
Clorfenvinfos	0.070	100	4	Nuarimol	0.280	100	2
Clorprofam	0.204	99.8	13	o,p0-DDD	0.988	100	10
Clorpirifos	0.132	100	5	o,p0-DDE	0.285	99.7	11
Clorprifos- metilo	0.019	99.9	9	o,p0-DDT	0.228	99.5	9
Clortal-dimetilo	0.256	100	4	o-fenilfenol	1.031	100	4
Clorotalonil	0.074	99.7	14	Oxadixilo	0.279	100	2
Deltametrín	0.038	99.9	14	Oxifluorfen	0.044	99.9	10
Diazinón	0.038	99.7	13	Paclobutrazol	0.288	100	4
Diclorán	0.133	99.7	13	Paratión	0.070	99.9	5
Diclorvos	0.016	100	9	Paratión-metilo	0.021	99.6	6
Dicofol	0.955	99.9	6	Penconazol	0.536	100	4
Dieldrín	0.045	100	5	Pendimetalina	0.105	99.7	10
Difenoconazol	0.402	100	1	Permetrina	0.213	100	2
Diflufenican	0.114	99.8	13	Pirazofos	0.104	100	4
Disulfotón	0.014	99.1	14	Piridabén	0.225	99.9	4
Endosulfán alfa	0.046	100	2	Pirimetamil	0.370	99.8	8
Endosulfán beta	0.043	99.5	7	Pirimicarb	0.017	99.9	7
Endosulfán sulfato	0.054	100	3	Pirimifos-metilo	0.062	100	4
Endrín	0.040	99.6	8	Piriproxifén	0.128	99.9	2
EPN	0.549	99.2	14	Procimidona	0.192	99.9	5
Esfenvalerato	0.245	100	5	Propiconazol	0.096	99.9	8
Etiofencarb	0.187	99.8	7	Propoxur	0.26	99.5	9
Etión	0.153	100	3	Protiofos	0.244	99.8	8
Etopenprox	0.920	99.9	5	Quinalfos	0.559	99.9	5
Etoprofos	0.500	99.7	7	Chinometionato	0.361	99.9	9
Etridiazol	0.027	99.9	5	Simacina	0.046	99.8	13
Etrimfos	0.082	99.8	6	Sulfotep	0.020	99.9	15
Famoxadona	0.010	99.9	6	Tau-fluvalinato	0.093	100	2
Fenamifos	0.081	100	3	Tebuconazol	0.346	99.9	3
Fenarimol	0.219	100	5	Terbutilacina	0.108	99.8	8
Fenbuconazol	1.045	100	2	Tetraconazol	0.258	100	8
Fenitrotión	0.017	99.8	10	Tetradifón	0.060	100	3
Fenpropatrín	0.036	99.8	5	Tetrametrín	0.299	99.5	9
Fenpropimorfo	0.558	99.6	6	Tiometón	0.112	99.9	14
Fentión	0.061	100	7	Tolclofos- metilo	0.062	99.8	15
Fentoato	0.178	99.8	9	Triadimefón	0.171	99.9	3
Fenvalerato	0.266	100	5	Triadimenol	0.441	100	4
Fipronil	0.168	100	3	Triclorfón	0.009	100	8
Fluazifop-butilo	0.001	99.8	10	Trifloxistrobin	0.210	99.7	7
Flucitrinato	0.358	100	10	Triflumizol	0.140	99.9	13
Fludioxonil	0.271	100	3	Trifluralina	0.047	99.8	6
Flusilazol	0.645	99.9	10	Vinclozolina	0.127	99.8	7
Flutolanil	2.273	100	2				

b, pendiente; R², coeficiente de correlación; RSD, desviación estándar relativa de factor respuesta (n=20)

(Camino, F. J, et al., 2011)



Anexo 3. Incertidumbre estimada expandida (U^a) para la matriz de tomate.

Compuesto	U	Compuesto	U
Acrinatrina	25%	Furalaxilo	21%
Aldrín	32%	Furatiocarb	30%
Atrazina	33%	Heptacloro	24%
Azinfos- etil	31%	Heptacloro-epóxido	29%
Azoxistrobina	34%	Heptenofos	32%
Benalaxil	27%	Hexaconazol	25%
Benfluralín	25%	Iprodiona	29%
Bifentrín	25%	Isocarbofos	23%
Bitertanol	27%	Isofenfos	22%
Bromopropilato	23%	Isofenfos-metilo	21%
Bupirimato	26%	Cresoxim-metilo	29%
Buprofecina	29%	Lindano	23%
Carbaril	33%	Malatión	35%
Carbofenotión	25%	Mecarbam	20%
Chinometionato	32%	Metalaxilo	32%
Clorfenapir	30%	Metribucina	24%
Clorfenvinfos	20%	Mevinfos	29%
Cloroprofam	33%	Miclobutanilo	24%
Clortalonil	29%	Nuarimol	25%
Clorpirifos	22%	o,p0-DDD	20%
Clorpirifos-metilo	35%	o,p0-DDE	18%
Clortal-metilo	27%	o,p0-DDT	18%
Lambda-Cihalotrín	26%	O-fenilfenol	29%
Cipermetrina	46%	Oxadixilo	20%
Ciproconazol	35%	Oxifluorfen	23%
Deltametrín	35%	Paclobutrazol	24%
Diazinón	25%	Paratión	25%
Diclorvos	37%	Paratión-metilo	34%
Diclorán	23%	Penconazol	23%
Dicofol	26%	Pendimetalina	18%
Dieldrín	25%	Permetrina	27%
Difenoconazol	30%	Fentoato	19%
Diflufenicán	20%	Pirimicarb	23%
Disulfoton	19%	Pirimifos-metilo	24%
Etoprofos	26%	Procimidona	22%
Endosulfán alfa	29%	Propiconazol	23%
Endosulfán beta	21%	Propoxur	38%
Endosulfán sulfato	30%	Protiofos	30%
Endrín	22%	Piprazofos	34%
EPN	29%	Piridabén	24%
Esfenvalerato	21%	Pirimetanil	24%
Etiofencarb	33%	Piriproxifén	27%
Etión	22%	Quinalfos	32%
Etofenprox	30%	Simacina	24%
Etridiazol	25%	Sulfotep	21%
Etrimfos	31%	Tau-fluvalinato	27%
Famoxadona	25%	Tebuconazol	21%
Fenamifos	30%	Terbutilacina	24%
Fenarimol	26%	Tetraconazol	21%
Fenbuconazol	23%	Tetradifón	25%
Fenitrotión	30%	Tetrametrín	21%
Fenpropatrín	21%	Tiometón	29%
Fenpropimorfo	27%	Tolclofos-metilo	18%
Fentión	25%	Triadimefón	29%
Fenvalerato	26%	Triadimenol	23%
Fipronil	26%	Triclorfón	24%
Fluazifop-butilo	21%	Trifloxistrobina	32%
Flucitrinato	21%	Triflumizol	29%
Fludioxonil	27%	Trifluralina	29%
Flusilazol	18%	Vinclozolina	28%
Flutolanil	24%		

^a Incertidumbre estimada para un nivel de confianza de 95% (k=2) (Camino, F. J, et al., 2011).

Anexo 4. Precisión y exactitud. Ensayos de recuperación (matriz de tomate).

Compuesto	%R ^a (%RSD)		Compuesto	%R ^a (%RSD)	
	LDC	10LDC		LDC	10LDC
Acrinatrina	87(13)	105(9)	Flutolanil	104(11)	102(14)
Aldrin	86(14)	99(17)	Furalaxilo	108(4)	113(13)
Atrazina	100(14)	100(20)	Furatiocarb	96(20)	102(12)
Azoxistrobina	98(11)	101(17)	Heptacloro	100(7)	106(8)
Benalaxil	100(12)	106(17)	Heptacloro-epóxido	88(19)	102(18)
Benfluralina	88(10)	97(18)	Heptenofos	116(13)	85(15)
Bifentrina	94(12)	104(13)	Hexaconazol	106(11)	105(11)
Bitertanol	104(5)	112(14)	Iprodiona	88(10)	94(20)
Bromopropilato	102(8)	106(10)	Isocarbofos	100(12)	98(10)
Bupirimate	104(11)	106(20)	Isofenfos	104(11)	102(16)
Buprofecina	104(19)	102(15)	Isofenfos-metilo	106(14)	99(14)
Carbaril	100(12)	99(15)	Cresoxim-metilo	102(11)	105(14)
Carbofenotión	110(11)	95(16)	Lindano	96(9)	103(8)
Lambda-Cihalotrin	96(20)	108(9)	Malatión	103(17)	85(15)
Cipermetrina	85(20)	94(20)	Mecarbam	102(4)	90(13)
Ciproconazol	110(17)	101(20)	Metalaxilo	102(15)	99(20)
Clorfenapir	113(9)	105(13)	Metribucina	102(8)	102(19)
Clorfenvinfos	104(9)	97(20)	Mevinfos	100(14)	87(8)
Clorprofam	108(9)	96(12)	Miclobutanilo	108(10)	106(10)
Clorpirifos	106(8)	94(16)	Nuarimol	104(16)	111(6)
Clorpirifos-metilo	106(14)	85(9)	o,p0-DDD	100(5)	92(8)
Clortal-dimetil	106(13)	96(17)	o,p0-DDE	114(5)	110(15)
Clorotalonil	85(20)	95(16)	o,p0-DDT	94(10)	82(13)
Deltametrin	86(18)	97(7)	O-fenilfenol	100(10)	97(15)
Diazinón	108(5)	102(14)	Oxadixilo	100(7)	107(9)
Diclorán	104(9)	94(78)	Oxifluorfen	104(5)	100(7)
Diclorvos	110(7)	111(14)	Paclobutrazol	104(11)	107(13)
Dicofol	94(6)	99(17)	Paratión	108(8)	92(15)
Dieldrin	100(7)	102(17)	Paratión-metilo	110(9)	91(19)
Difenoconazol	106(16)	105(18)	Penconazol	104(9)	104(13)
Diflufenicán	98(15)	103(5)	Pendimetalina	105(10)	110(6)
Disulfoton	104(9)	100(8)	Permetrina	102(13)	103(15)
Endosulfan alfa	94(18)	102(16)	Pirazofos	94(6)	100(13)
Pirimicarb	96(6)	98(18)	Piridabén	98(17)	103(9)
Endosulfan beta	88(5)	106(13)	Pirimetanil	100(14)	106(10)
Endosulfan sulfato	85(8)	95(14)	Pirimifos-metilo	106(8)	97(18)
Endrin	102(4)	103(12)	Piriproxifen	102(11)	105(18)
EPN	98(9)	84(16)	Procimidona	102(8)	101(13)
Esfenvalerato	84(14)	103(11)	Propiconazol	130(14)	106(9)
Etifencarb	90(19)	78(9)	Propoxur	85(16)	81(15)
Etión	106(13)	98(12)	Protiofos	106(5)	93(8)
Etofenprox	102(8)	97(20)	Quinalfos	108(8)	101(20)
Etoprofos	104(9)	96(20)	Chinometionato	85(18)	89(7)
Etridiazol	115(5)	114(8)	Simacina	102(13)	101(18)
Etrimfos	110(6)	92(16)	Sulfotep	104(9)	86(12)
Famoxadona	100(12)	108(14)	Tau-fluvalinato	86(18)	108(9)
Fenamifos	100(12)	104(20)	Tebuconazol	104(9)	104(13)
Fenarimol	102(15)	106(11)	Terbutilacina	100(12)	99(15)
Fenbuconazol	106(8)	103(14)	Tetraconazol	102(8)	111(12)
Fenitrotión	114(13)	110(5)	Tetradifon	98(13)	105(14)
Fenpropatrina	98(5)	109(8)	Tetrametrin	106(8)	106(8)
Fenpropimorfo	110(5)	105(17)	Tiometón	102(8)	80(14)
Fentión	106(5)	88(15)	Tolclofos-metilo	104(5)	86(8)
Fentoato	106(5)	74(12)	Triadimefon	106(8)	104(11)
Fenvalerato	86(18)	110(15)	Triadimenol	110(6)	105(12)
Fipronil	85(20)	110(11)	Triclorfon	105(12)	121(6)
Fluacifop-butilo	108(8)	110(15)	Trifloxistrobina	108(4)	109(12)
Flucitrinato	94(6)	103(13)	Triflumizol	114(8)	105(12)
Fludioxonil	100(12)	100(158)	Trifluralina	88(12)	98(18)
Flusilazol	114(5)	112(5)	Vinclozolina	106(11)	98(20)

Media de 5 determinaciones

(Camino, F. J, et al., 2011)

Anexo 5. Aplicación del método QuEChERS validado.

Matriz	Número de muestras (positivos, %)	Compuesto	Mín. (mg kg ⁻¹)	Máx. (mg kg ⁻¹)	LMR ^a (mg kg ⁻¹)	Positivos (%)
Tomate	944 (554, 58.7%)	Azoxistrobina	0.01	0.06	2.00	6 (0.6%)
		Bifentrina	0.01	0.11	0.20	201 (21.3%)
		Bitertanol	0.03	0.06	3.00	3 (0.3%)
		Buprofecina	0.01	0.08	1.00	14 (1.5%)
		Clorpirifos	0.01	0.01	0.50	1 (0.1%)
		Clorpirifos-metilo	0.02	0.04	0.50	6(0.6%)
		Cipermetrina	0.01	0.04	0.50	10 (1.1%)
		Ciproconazol	0.01	0.02	0.05	5 (0.5%)
		Deltametrín	0.01	0.07	0.30	40 (4.2%)
		Difenoconazol	0.01	0.01	2.00	2 (0.2%)
		Suma de endosulfán alfa, beta y sulfato	0.06	0.06	0.50	1 (0.1%)
		Etiofencarb	0.02	0.02	0.01	1 (0.1%)
		Etofenprox	0.01	0.06	1.00	14 (1.5%)
		Etridiazol	0.01	0.03	0.05	4 (0.4%)
		Fenamifos	0.02	0.02	0.05	1 (0.1%)
		Flucitrinato	0.01	0.01	0.05	1 (0.1%)
		Fludioxonilo	0.01	0.06	1.00	23 (2.4%)
		Hexaconazol	0.07	0.09	0.10	2 (0.2%)
		Iprodiona	0.02	0.10	5.00	5 (0.5%)
		Cresoxim-metilo	0.02	0.02	0.50	2 (0.2%)
		Metalaxilo	0.01	0.04	0.20	22 (2.3%)
		Metribucina	0.04	0.07	0.10	3 (0.3%)
		Miclobutanilo	0.02	0.05	0.30	2 (0.2%)
		Pirimicarb	0.01	0.08	1.00	10 (1.1%)
		Pirimifos- metil	0.02	0.18	1.00	3 (0.3%)
		Procimidona	0.01	0.01	2.00	2 (0.2%)
		Pirazofos	0.01	0.01	0.05	3 (0.3%)
		Piridabén	0.01	0.14	0.30	106 (11.2%)
		Pirimetanil	0.01	0.20	1.00	25 (2.6%)
		Piriproxifén	0.01	0.17	1.00	46 (4.9%)
		Tebuconazol	0.01	0.22	1.00	52 (5.5%)
		Suma de triadimefón y triadimenol	0.01	0.29	0.30	45 (4.7%)
		Pimiento	80 (25, 31.3%)	Azoxistrobina	0.05	0.05
Clorpirifos- metilo	0.03			0.03	0.30	1 (1.3%)
Cipermetrina	0.02			0.02	0.10	1 (1.3%)
Ciproconazol	0.02			0.02	0.05	1 (1.3%)
Diclorán	0.01			0.01	0.01	1 (1.3%)
Etridiazol	0.01			0.01	0.05	1 (1.3%)
Fenarimol	0.01			0.04	0.05	3 (3.8%)
Fludioxonilo	0.02			0.04	0.05	5 (6.3%)
Furatiocarb	0.02			0.03	0.10	3 (3.8%)
Metalaxilo	0.01			0.09	0.10	2 (2.5%)
Miclobutanilo	0.01			0.05	0.05	4 (5.0%)
o,p0-DDD	0.02			0.02	1.00	1 (1.3%)
Pirimicarb	0.08			0.08	0.10	1 (1.3%)
Procimidona	0.04			0.04	0.10	1 (1.3%)
Piridabén	0.08			0.08	0.05	1 (1.3%)
Pirimetanil	0.12			0.25	0.10	2 (2.5%)
Piriproxifén	0.01			0.05	0.05	2 (2.5%)
Suma de triadimefón y triadimenol	0.01	0.10	0.20	11 (13.8%)		

LMR^a: Límite máximo de residuo.

(Camino F.J, et al., 2011)

Anexo 5. Continuación. Aplicación del método QuEChERS validado.

Matriz	Número de muestras (positivos, %)	Compuesto	Mín. (mg kg ⁻¹)	Máx. (mg kg ⁻¹)	LMR ^a (mg kg ⁻¹)	Positivos (%)
Lechuga	10 (1, 10.0%)	Deltametrín	0.06	0.06	0.50	1 (10.0%)
Pepino	189 (65, 34.4%)	Azoxistrobina	0.01	0.01	1.00	1 (0.5%)
		Bifentrina	0.01	0.01	0.10	2 (1.1%)
		Bitertanol	0.01	0.01	0.50	2 (1.1%)
		Bupirimato	0.01	0.02	1.00	3 (1.6%)
		Buprofecina	0.01	0.02	1.00	2 (1.1%)
		Cipermetrina	0.01	0.02	0.20	2 (1.1%)
		Suma de endosulfán alfa, beta y sulfato	0.01	0.01	0.05	1 (0.5%)
		EPN	0.02	0.02	0.01	1 (0.5%)
		Etridiazol	0.02	0.02	0.10	1 (0.5%)
		Fenarimol	0.02	0.02	0.20	1 (0.5%)
		Fludioxonilo	0.01	0.08	1.00	12 (6.3%)
		Iprodiona	0.08	0.18	2.00	4 (2.1%)
		Metalaxilo	0.02	0.11	0.50	17 (9.0%)
		Miclobutanilo	0.01	0.04	0.10	3 (1.6%)
		o,p0-DDD	0.01	0.04	0.05	3 (1.6%)
		Penconazol	0.01	0.03	0.10	5 (2.6%)
		Permetrin	0.01	0.01	0.05	1 (0.5%)
		Pirimicarb	0.01	0.01	1.00	1 (0.5%)
		Procimidona	0.06	0.10	1.00	2 (1.1%)
		Piridabén	0.06	0.06	0.10	1 (0.5%)
Pirimetanil	0.01	0.23	1.00	8 (4.2%)		
Tebuconazol	0.01	0.05	0.50	3 (1.6%)		
Suma de triadimefón y triadimenol	0.01	0.07	0.10	8 (4.3%)		
Triflumizol	0.02	0.05	0.20	4 (2.1%)		
Berenjena	23(1, 4.3%)	Pirimetanil	0.01	0.01	1.00	1 (4.3%)
Calabacín	61 (9, 14.8)	Cipermetrina	0.04	0.04	0.20	1 (1.6%)
Melón	60 (20, 33.3%)	Azoxistrobina	0.01	0.04	0.50	6 (10.0%)
		Bifentrina	0.01	0.02	0.05	2 (3.3%)
		Buprofecina	0.03	0.03	1.00	1 (1.7%)
		Suma de triadimefón y triadimenol	0.01	0.05	0.10	13 (21.7%)
Sandía	78 (13, 16.7%)	Azoxistrobina	0.01	0.18	0.50	3 (3.8%)
		Bifentrina	0.02	0.03	0.05	3 (3.8%)
		Buprofecina	0.02	0.02	0.50	1 (1.3%)
		Deltametrín	0.01	0.01	0.20	1 (1.3%)
		Fenamifos	0.01	0.01	0.05	1 (1.3%)
		Lambda-cihalotrina	0.01	0.01	0.05	2 (2.6%)
		Suma de triadimefón y triadimenol	0.01	0.07	0.10	10 (12.8%)
Manzana	18 (0, 0%)	-	-	-	-	

LMR^a: Límite máximo de residuo.

(Camino F.J, et al., 2011)

Anexo 6. Campos de aplicación del método QueChERS.

Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentarios	Referencia
GC-MS/MS con triple cuadrupolo (QQQ)	Pera, tomate, pepino, alubias, fruto de symphoricarpos	Piretroides (total 10)	Rango estimado 0.3 - 4.9 µg/kg (S/N=3)	~ 10 µg/kg, a excepción de 3 piretroides (Bifenthrin, 1 µg/kg; cyfluthrin, 13 µg/kg; cypermethrin, 15 µg/kg)	<ul style="list-style-type: none"> * 25 g de muestra y Clean-up con C18+ PSA +MgSO4. * Ratio acetonitrilo- matriz: 1. * Columna HP-5ms Ultra Inert. * Columna "backflushing". * Volumen inyección: 1 µL (en acetonitrilo). * Rango recuperaciones:78.8 -118.6, con %RSD 14.8% medio. * Rango lineal:10-100 µg/kg. * Tiempo de análisis: 20 min. 	Lin XY et al., 2018
	Tomate	Herbicida Metribucina y sus metabolitos	Rango: 0.2 -0.8 µg/kg	Rango: 6 - 28 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 5 g de muestra y Clean-up con GCB + PSA +MgSO4. * Ratio acetonitrilo- matriz: 4. * Columna HP-5ms Ultra Inert. * Volumen inyección: – (en metanol). * Rango recuperaciones: 72.35% -95.86 %. con % RSD 1.98% -8.70%. * Rango lineal: 10-100 µg/kg. * Tiempo de análisis: 10 min. 	Xie YL et al., 2017
	Té	89 pesticidas	Rango: 1 -25 µg/kg	Rango: 10 -50 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 4 g de muestra + 16 mL H₂O destilada y extracto se pasa por un cartucho de florisil. * Ratio acetonitrilo (1% ácido)- matriz: 2.5. * Columna HP-5ms Ultra Inert. * Rango recuperaciones: 60 -120 %, con %RSD ≤20%. * Inyección: en acetona-N-hexano ((1:1 v/v). * Rango lineal:1-250 µg/kg. * Tiempo de análisis: 36 min. 	Wu CC., 2017

Anexo 6. Continuación. Campos de aplicación del método QueChERS.

Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentarios	Referencia
GC/MS-MS con triple cuadrupolo (QQQ)	Grosellas negras	189 pesticidas	Se consideró el valor del LDC	10 µg/kg, a excepción de 9 con 50 µg/kg y 3 con 200 µg/kg. Para captan, Dimethoate y Fenpiroximate se consideró 100 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 10 g de muestra + Clean-up con PSA + C18 + GCB. * Ratio acetonitrilo-matriz: 1. * Columna capilar DB-5. * Columna "backflushing" previa (retro-lavado). * Inyección en tolueno, aunque algunas han sido estabilizadas con acetonitrilo al 1% de ácido fórmico (1:1 (v/v)). * Rango recuperaciones: 70- 116 %, con %RSD 3-19%, a excepción Chlorothalonil con 23%. * Rango lineal: 5-500 µg/kg, para la mayoría. * Tiempo de análisis: 36 min. 	Walorczyk S., 2014
	Arroz y harina de trigo	100 pesticidas	-	3.6 µg/kg, para el 80% de ellos, a excepción en los que se establece 6 µg/kg y 12 µg/kg.	<ul style="list-style-type: none"> * 5 g de muestra + Clean-up con PSA+ C18 + MgSO4 (En harinas, se emplea un cartucho de florisil). * Ratio aceto de etilo- matriz: 2. * Columna capilar VF-5ms. * Precolumna de sílice fundida de Supelco. * Volumen de inyección 10 µL. * Rango recuperaciones 78- 109 % en arroz y 79-116% en harina, con %RSD ≤ 20%. * Rango lineal 3.6-150 µg/kg, para el 80%. * Tiempo de análisis: 27.4 min. 	Grande A. et al., 2017
	Aceites vegetales comestibles	255 pesticidas	-	Rango: 5 -50 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 0.5-1.0-2.0-5.0 g de muestra + 5 mL agua. * Clean-up: diferentes combinaciones con PSA, C18 y GCB, EMR adsorbente (NaCl/ MgSO4 (1:4)). * Ratio acetonitrilo-matriz: 20-10-5-2. * Columna capilar VF-5ms y una pre-columna de sílice fundida de Supelco. * Volumen de inyección 1 µL (en acetato de etilo). * Rango recuperaciones: 70 -120%, con %RSD ≤ 20%. * Rango lineal 2- 500 µg/kg, para el 80%. * Tiempo de análisis: 40.5 min. 	He Z. et al., 2017

Anexo 6. Continuación. Campos de aplicación del método QueChERS

Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentarios	Referencia
GC/MS-MS con triple cuadrupolo (QQQ)	Manzanas y suelos	Bromotalonil	0.09 µg/kg	0.31 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 10 g de muestra +5 ml H₂O destilada (Extracción con ultrasonidos) + Clean-up con PSA + MgSO₄. * Ratio aceto de etilo- matriz:1. * Columna capilar RMX-35ms. * Volumen de inyección 1 µL (en acetato de etilo). * Rango recuperaciones: 80.8- 106 %, con %RSD entre 3.08 - 7.09%. * Rango lineal: 10-100 µg/kg. * Tiempo de análisis: 13.6 min. 	Liu H. et al., 2014
	Tomate, manzana, cebolla y naranja	210 pesticidas	5 µg/kg	10 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 10 g de muestra + mezcla sales NaCl+ MgSO₄ (no clean-up) MÉTODO ACETATO ETILO. * Ratio aceto de etilo- matriz:1. * Columna capilar HP-5ms Ultra Inert. * Columna de “backflushing” (retro-lavado). * Volumen de inyección: 2 µL (en acetato de etilo). * Rango recuperaciones 70 -120 % para el 80%, con %RSD≤ 20 %. * Rango lineal: 0.5 -1000 µg/kg. *Tiempo de análisis: 20 min + 3 min “backflushing” 	Uclés S. et al., 2014
	Espinacas	85 pesticidas (hidrofílicos, hidrofóbicos, bajo y alto peso molecular, carbamatos, organofosforados y organoclorados)	Rango: 1-10 µg /kg	3 x desviación estándar	<ul style="list-style-type: none"> * 10 g muestra. * Tras 1ª fase de adición de sales se concentra y redissuelve en 3 disolventes distintos: metanol, acetonitrilo y acetonitrilo + H₂O (Ratio acetonitrilo/matriz: 1). * Extracto se pasa por membrana de filtración. * Clean –up con cartucho GC/NH₂. * HP4750 Stirred Cell p filtración +SepPak bomba elución. * TRACE GC Ultra acoplado a MS (Polaris Q). * Columna capilar DB-5MS. * Recuperaciones filtración GK: 70.5-95.2%, con %RSD ≤20%. * Rango lineal: 50-400 µg /kg. * Volumen de inyección: 2 µL. * Tiempo análisis: 40 min. 	Hong J. et al 2016)

Anexo 6. Continuación. Campos de aplicación del método QueChERS.

Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentarios	Referencia
GC-MS-QP2010 Ultra	Alcachofas	35 pesticidas (otros 63 pesticidas por LC)	Rango: 5-25 µg /kg.	10 µg /kg	<ul style="list-style-type: none"> * 2 g muestra + 4 mL H₂O mili-Q. * 3 metodologías de extracción: con QuEChERS citrato con acetonitrilo, con acetato de etilo y MSPD. * Ratio acetonitrilo o acetato de etilo/matriz: 1. * Clean-up con 150 mg de CaCl₂ + 150 mg PSA o 200 mg de MgSO₄ + 200 mg de GCB + 150 mg de PSA o columna con los adsorbentes de Clean-up: 0.4 g de GCB + 3.6 g de Florisil + 1.0 g muestra mezclada en mortero con Na₂SO₄. * La inyección por GC-MS/MS es con acetato de etilo. * Columna capilar TR-5MS Thermo. * Recuperación QuEChERS: 70%-120%, con %RSD ≤20% * Rango lineal: 50-400 µg /kg . * Volumen de inyección: 1 µL. * Tiempo de análisis: 45 min. 	Machado I. et al., 2017
GC/MS-MS con triple cuadrupolo (QQQ)	Mango (verdes y maduros)	56 pesticidas	4 µg /kg	10 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 10 g de muestra + Clean-up optimizado con varias mezclas de PSA + GCB. * Ratio acetonitrilo acidificado-matriz: 1. * Columna capilar HP-5MS. * Volumen inyección: 1 µL (en n-hexano). * Rango recuperaciones: 70- 120 %, con %RSD ≤20%. * Rango lineal: 5-500 µg/kg, para la mayoría. * Tiempo de análisis: 33.8 min. 	Li P. et al., 2018
	Tomate, pimiento, lechuga, pepino, berenjena, calabacín, melón, sandía y manzana	121 pesticidas	Rango Estimado para (S/N)= 3; 1-3 µg /kg	10 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * 15 g de muestra + Clean-up PSA + MgSO₄ * Ratio acetonitrilo -matriz: 0.67. * Columna capilar Varian Factorfour VF-5MS. * Volumen inyección: 6 µL (en acetonitrilo). * Rango recuperaciones: 85-115 %, con %RSD ≤20%. * Rango lineal: 6-100 µg/kg. * Tiempo de análisis: 30.9 min. 	Camino F.J. et al., 2011

