

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales



Grado en Química

Análisis de residuos de pesticidas en productos ecológicos mediante cromatografía de líquidos.

Analysis of pesticide residues in organic products by liquid chromatography.

José Estrada Pomares

Curso académico 2017-2018

Fecha 14/09/2018

Tutor/es
Dr. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba
Departamento de Química y Física
Dra. Carmen Ferrer Amate
Departamento de Química y Física

**Análisis de residuos de pesticidas en productos ecológicos mediante
cromatografía de líquidos**

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
José Estrada Pomares

Almería, 14 de Septiembre de 2018

Fdo: José Estrada Pomares

Fdo: Amadeo Rodríguez Fernández-Alba

Fdo: Carmen Ferrer Amate

Agradecimientos

Este trabajo fin de grado representa para mí el evento final tras años de estudio, y no podría concluirlo sin agradecer el apoyo y la ayuda recibida por parte de Amadeo, Ana, May, Fran, María, y en general de todo el grupo de trabajo del que me he sentido parte durante los meses que he dedicado a la parte experimental.

Y en especial le quiero dar las gracias a Carmen por su guía incondicional durante la elaboración de este trabajo.

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. AGRICULTURA ECOLÓGICA	5
3.1.1. Marco regulatorio para residuos de pesticidas en alimentos ecológicos	7
3.2. MÉTODO QuEChERS	8
3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	10
3.3.1. Aspectos generales de la Cromatografía Líquida	10
3.3.2. Clasificación en función de la polaridad	10
3.3.3. Espectrometría de masas	11
4. OBJETIVOS	16
5. MÉTODOS EXPERIMENTALES	16
5.1. MATERIALES Y REACTIVOS	16
5.2. ANÁLISIS MEDIANTE LC-QqQ-MS/MS	17
5.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	17
5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	18
5.4.1. Extracción de pesticidas en frutas y verduras con bajo contenido en grasas (QuEChERS citrato)	18
5.4.2. Extracción de pesticidas en muestras de aceite	18
5.4.3. Extracción de pesticidas en frutas y verduras con alto contenido en grasas (aguacate)	19
5.4.4. Extracción de pesticidas en muestras de té	19
5.4.5. Extracción de pesticidas en muestras de especias	20
5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
7. CONCLUSIONES	27
8. BIBLIOGRAFÍA	27
9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	29
ANEXOS	31
ANEXO I: PLAGUICIDAS, TIEMPOS DE RETENCIÓN E IONES MONITORIZADOS EN EL MÉTODO DE ANÁLISIS MEDIANTE LC-MS/MS	33
ANEXO II: MATRICES ANALIZADAS	38
ANEXO III: RESULTADOS	41

1. RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron una serie de matrices vegetales, como frutas, hortalizas, té y aceite, todas de origen ecológico, con el objetivo de determinar la presencia de residuos de pesticidas en dichas muestras. Para la extracción se empleó el método QuEChERS, introduciendo variaciones en el procedimiento de extracción en función de las características de la matriz. El análisis se llevó a cabo por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS). El 14% de las muestras analizadas contenía residuos de pesticidas por encima de los límites de cuantificación (LOQ) de los métodos. En algunos casos las concentraciones superaban los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos por la Comisión Europea.

Palabras clave: *Ecológico, QuEChERS, LC-MS/MS, pesticidas.*

2. ABSTRACT

In this paper, different organic matrices such as fruits, vegetables, tea and oil were analyzed, all them from organic production, with the aim to determine the presence of pesticide residues in this type of products. QuEChERS method was used for the extraction of pesticide residues. Depending on the characteristics of the matrices, variations were introduced in some cases in the extraction stage. Finally, analysis was carried out by liquid chromatograph coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). 14% of the samples analyzed contained pesticide residues above the limits of quantification (LOQ) of the method. In certain cases, concentrations were above the EU Maximum Residue Levels (MRLs) set by European Commission.

Keywords: *Organic, QuEChERS, LC-MS/MS, pesticide residues.*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. AGRICULTURA ECOLÓGICA

El desarrollo de la agricultura intensiva supuso la resolución de problemas como plagas y enfermedades que actúan sobre los cultivos provocadas por insectos, bacterias, hongos y virus. En la actualidad se utilizan grandes cantidades de pesticidas y fertilizantes sintéticos con el fin de aumentar la productividad de las cosechas. La mayoría de estos pesticidas son bioacumulables, y cuando se aplican de manera excesiva pueden quedar residuos en los productos posteriores que llegan al consumidor. La exposición a estos compuestos no sólo representa un riesgo para la salud humana, sino que también se considera una fuente de contaminación ambiental, además de provocar efectos adversos en la fauna presente [1,2].

En los últimos años se han introducido en el mercado alimentos producidos con control integrado de plagas. Estos se denominan productos MIP (manejo integrado de plagas) o productos CIP (control integrado de plagas). El sistema de lucha integrada es una alternativa al uso de pesticidas. Consiste en la inserción de una plaga no perjudicial en los cultivos para combatir a aquellos insectos que si son perjudiciales para la planta. El sistema de lucha integrada o control de plagas engloba una serie de técnicas basadas en la prevención. Cada vez son más los países que apuestan por este sistema de producción. El conjunto de técnicas MIP están principalmente orientadas para la agricultura bio-intensiva con el objetivo de prescindir del uso de pesticidas sintéticos. En la intervención con MIP se introducen predadores naturales, parásitos y patógenos, con el fin de controlar la población de plagas manteniendo niveles de población no perjudiciales para la planta. También se incluyen en estos sistemas algunas técnicas orientadas a mejorar el crecimiento y los mecanismos de defensa de la planta como la rotación de cultivos [3].

La agricultura ecológica es un modelo de agricultura respetable con el medio ambiente en el que se evita el uso de una gran cantidad de compuestos sintéticos, como pesticidas, aditivos, fertilizantes o antibióticos. Este nuevo sistema prohíbe el uso de la gran mayoría de pesticidas sintéticos, aunque permite el uso de algunos compuestos naturales en determinadas cantidades, obteniéndose de esta forma alimentos prácticamente exentos de residuos. En los últimos años se ha incrementado la demanda de productos ecológicos, también denominados “orgánicos”. Cada vez hay más personas que optan por la compra de estos alimentos en sustitución a los productos derivados de la agricultura convencional. Esto se debe a una mejor aceptación de aquellos sistemas de producción alternativos que evitan el uso de compuestos químicos y que los consumidores consideran más saludables y con un menor impacto ambiental [4].

Los pesticidas que se emplean en los sistemas de cultivo convencionales están regulados por organismos gubernamentales con el objetivo de proteger de su exposición tanto a los trabajadores como a los consumidores, además de minimizar su impacto en el ecosistema. Uno de los grandes desafíos que afrontan las agencias reguladoras gubernamentales es reducir la exposición a los residuos de pesticidas principalmente en el sector de la población comprendido por las mujeres embarazadas, bebés y niños. Estos organismos regulan el tipo de cosecha que puede ser tratada con un determinado compuesto químico, la cantidad de dicho compuesto y durante qué periodo de tiempo puede administrarse. Es necesario dejar un tiempo

antes de la recolección para que los pesticidas se disipen y evitar así concentraciones elevadas en los alimentos que llegan al consumidor.

Los agricultores que cultivan productos hortofrutícolas ecológicos a gran escala utilizan principalmente pesticidas naturales. Estas sustancias se extraen de plantas o microorganismos y están regulados de igual forma que los pesticidas comunes. Sin embargo, algunos de los pesticidas naturales pueden presentar cierto riesgo para la salud del consumidor, como por ejemplo la rotenona; un insecticida conocido por causar Parkinson en animales y posiblemente también en humanos. Para la rotenona en concreto, su uso está restringido en los Estados Unidos, y totalmente prohibido en los sistemas de agricultura ecológica europeos [5].

Además, existe una serie de compuestos sintéticos que sí están permitidos en el sistema de producción ecológica. La toxicidad de estos pesticidas es baja y tienen un bajo riesgo de provocar efectos perjudiciales en la salud o en el ecosistema. Los compuestos sintéticos más aplicados en la agricultura ecológica son: compuestos de sulfuro, compuestos fungicidas de cobre, aceites en aerosol, disoluciones insecticidas y feromonas de insectos. Normalmente a los agricultores ecológicos se les permite el empleo de pesticidas cuando no es posible un control sobre las plagas sin su uso. La aplicación de estos compuestos se encuentra limitada para minimizar el impacto medioambiental y reducir la posibilidad de permanencia de residuos en las partes comestibles de la planta. También se pueden encontrar pesticidas sintéticos no permitidos en productos orgánicos, aunque generalmente en concentraciones por debajo de los LMRs. Y la variedad de pesticidas presentes suele ser menor en comparación con lo que se podría encontrar en productos obtenidos de la producción convencional. Cuando se trata de productos importados, el riesgo de encontrar alimentos con concentraciones de residuos por encima de los LMRs es mayor, tanto para alimentos convencionales como ecológicos [6].

A pesar de que los productos obtenidos mediante la agricultura ecológica tienen un menor riesgo de contener residuos, no excluye la posibilidad de que puedan contener estas sustancias. Esto no implica que se haya producido una aplicación directa de los mismos, ya que existen diversos factores que pueden provocar la contaminación de los cultivos orgánicos. Los productos ecológicos son cultivados, transportados y procesados en un entorno donde los pesticidas y otros compuestos artificiales suelen estar presentes; por tanto, se puede producir la contaminación del producto en su recorrido desde que se recolecta hasta que llega al consumidor. En algunas ocasiones los pesticidas pueden permanecer en el suelo suficiente tiempo como para contaminar cultivos posteriores. Otros pueden filtrarse hasta llegar a las aguas subterráneas y contaminar cultivos orgánicos próximos a otros cultivos convencionales [7].

Se han llevado a cabo estudios [8] en los que se demuestra la presencia de residuos de pesticidas en productos ecológicos, aunque en general coinciden en que, tanto la variedad como los niveles de concentración en los que se encuentran son muy inferiores en comparación con los alimentos convencionales.

La gran ventaja del consumo de alimentos ecológicos reside en la reducción del riesgo de padecer enfermedades derivadas de la acumulación de residuos en el cuerpo, principalmente en las células adiposas. Algunas de estas enfermedades son: cáncer, trastornos neurológicos, malformaciones en fetos, y otros efectos adversos que pueden desarrollarse por la exposición a pesticidas [9].

3.1.1. Marco regulatorio para residuos de pesticidas en alimentos ecológicos

Los principios de la agricultura ecológica se basan en la ausencia de pesticidas sintéticos, aunque sí se permite el uso de algunas sustancias naturales con propiedades análogas.

Para asegurar la calidad de los productos etiquetados como ecológicos, así como para justificar la confianza del consumidor, es necesario establecer un marco legal incluyendo una serie de normas que recojan las condiciones y requisitos para la aplicación de plaguicidas, recolección, procesado y etiquetado de estos alimentos.

La Comisión Europea es el organismo regulador en el ámbito europeo que elabora y actualiza los reglamentos que describen el correcto proceder en cada etapa del sistema de producción ecológica. Los principios y requisitos generales del uso de plaguicidas en la producción ecológica se establecen en los Reglamentos (CE) N° 834/2007¹ y (CE) N° 889/2008². El primero fija el marco legal sobre la producción, distribución, control y etiquetado en la producción ecológica. El segundo, y más concretamente una reciente modificación, el Reglamento (CE) N° 673/2016³ establece en su anexo II la lista de productos autorizados para su utilización en la producción ecológica en casos en los que se haya constatado la existencia de una amenaza para una cosecha. Dentro de los plaguicidas regulados se encuentran sustancias de origen vegetal o animal, como la Azadiractina extraída de *Azadirachta indica* o las piretrinas extraídas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, microorganismos utilizados para el control biológico de plagas y enfermedades, sustancias producidas por microorganismos, como el espinosad, sustancias para utilizar en trampas y/o dispersores, como la deltametrina o lambdacihalotrina, u otras sustancias utilizadas tradicionalmente en la agricultura ecológica, como el cobre o el azufre, entre otras.

Recientemente se ha publicado un nuevo reglamento de la producción ecológica, el Reglamento (CE) N° 2018/848⁴ que recoge un aumento del ámbito de aplicación de la norma, con la inclusión de nuevos productos como la sal, corcho y cera de abeja, entre otros. Este nuevo Reglamento entrará en vigor el 1 de enero de 2021.

(1) REGLAMENTO (CE) N° 834/2007 DEL CONSEJO de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos.

(2) REGLAMENTO (CE) N° 889/2008 DE LA COMISIÓN de 5 de septiembre de 2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control.

(3) REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (CE) 2016/673 DE LA COMISIÓN de 29 de abril de 2016 que modifica el Reglamento (CE) N° 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control.

(4) REGLAMENTO (CE) 2018/848 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 30 de mayo de 2018 sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos.

Además de las restricciones descritas, también se deben cumplir aquellas que figuran en el Reglamento (UE) N.º 540/2011⁵ de la comisión, aplicables a la agricultura en general.

Los países miembros de la Unión Europea han establecido unos niveles máximos de concentración aplicables a todos los compuestos fitosanitarios que se utilizan en la agricultura. Estos límites se denominan límites máximos de residuos (LMRs). Estos valores, junto con otra información derivada, se recogen en el Reglamento (CE) 396/2005⁶.

3.2. MÉTODO QuEChERS

El método de extracción de pesticidas más utilizado en la actualidad es el denominado método QuEChERS (de sus siglas en inglés “rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro”). Desarrollado en 2002 por Anastassiades y col. [10] se ha ido modificando desde entonces para aplicarlo a muestras cuyas matrices presentan propiedades que pueden dificultar la extracción de ciertos pesticidas, así como para extraer una mayor cantidad de pesticidas en los denominados análisis multiresiduo.

En el primer método desarrollado se utilizaba acetonitrilo como disolvente, seguido de una etapa de extracción líquido-líquido y retirada de agua utilizando hidróxido sódico y sulfato magnésico anhidro. Tras agitar y centrifugar la muestra, finalmente se realizaba una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva, utilizando PSA (amina primaria y secundaria) como sorbente para retirar la mayor parte de los interferentes polares de la matriz. Además, junto con el PSA se añadía de nuevo sulfato magnésico anhidro para asegurar la obtención de un extracto final sin presencia de agua. Sin embargo, en algunos casos la extracción de determinados pesticidas podía verse afectada por el pH del medio. Una de las adaptaciones del método la realizó Lehotay y col. introduciendo un tampón acetato en la etapa de extracción. Con esto consiguió mejorar la extracción de pesticidas sensibles al pH, con recuperaciones en un rango de 95 ± 10 para 32 pesticidas diferentes [11].

De forma paralela, Anastassiades y col. también introdujeron un tampón de pH en la primera etapa para favorecer la extracción, sólo que en su caso utilizó un tampón citrato. Actualmente es el método más empleado para la extracción de pesticidas a todo tipo de muestras. De manera que tamponando la disolución a pH 5-5.5 durante la etapa de extracción consiguieron mejorar la extracción de aquellos pesticidas sensibles al pH. El método QuEChERS presenta múltiples ventajas al ser un método flexible, aplicable una gran variedad de muestras y en análisis multiresiduo en los que se analizan simultáneamente cientos de pesticidas, obteniéndose en la mayoría de los casos valores de recuperaciones altos. En algunos casos las características

(5) REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) No 540/2011 DE LA COMISIÓN de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas.

(6) REGLAMENTO (CE) NO 396/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.

especiales de algunas matrices hacen necesario introducir modificaciones en el método original para asegurar buenas recuperaciones y minimizar la presencia de interferentes en el extracto final [12].

En aquellas muestras que presentan un alto contenido en lípidos es necesaria una etapa de limpieza más exhaustiva para retirar las grasas de la matriz. En el caso de muestras de aceites, se pueden utilizar una amplia variedad de adsorbentes, o bien introducir una etapa de limpieza adicional en la que se congela la muestra para provocar la precipitación de las grasas y de otros componentes de la matriz [13]. La amina primaria-secundaria (PSA) es el sorbente estándar que se emplea en la etapa de limpieza, pero en ocasiones se emplea mezclado con otros sorbentes como C18 o GCB (de sus siglas en inglés *Graphitized Carbon Black*). El GCB se emplea principalmente cuando la muestra presenta un alto contenido en pigmentos, como ocurre con las fresas. También se pueden obtener cartuchos comerciales con los sorbentes ya preparados como son el Oasis HLB (de sus siglas en inglés *Hydrophilic-Lipophilic Balance*). Además, se están introduciendo nuevos compuestos con mejores resultados en la extracción de residuos de pesticidas en aceites, como por ejemplo el dióxido de zirconio (Z-Sep o Z-Sep⁺) [14, 15].

En el aguacate, el mango y otras frutas y verduras con alto contenido en grasas también se incluyen variaciones en la etapa de limpieza con respecto al método QuEChERS con tampón citrato. Los métodos de limpieza más empleados en este tipo de productos son la precipitación de las grasas a baja temperatura, la cromatografía por permeación de gel o GPC (de sus siglas en inglés *Gel Permeation Chromatography*), y la adsorción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Los sorbentes más empleados en la etapa de limpieza son: mezclas de PSA y C18, sílica, Z-Sep y Z-Sep⁺. Estudios demuestran que con Z-Sep o Z-Sep⁺ se obtienen mejores recuperaciones que empleando mezclas de PSA y C18 en matrices como aguacates y almendras [16].

El té y otras hierbas de características similares son muestras muy secas y es necesario hidratarlas tras la homogenización. Además, tienen un alto contenido en sustancias interferentes que se co-extraen junto con los pesticidas de interés. En la etapa de limpieza de este tipo de muestras se suele emplear cloruro cálcico anhidro, PSA y C18 cuando hay un alto contenido en pigmentos [17].

Inicialmente, el método QuEChERS y sus primeras modificaciones estaban orientados a la extracción de pesticidas en muestras de frutas y hortalizas. Hoy en día es aplicable a una mayor variedad de muestras como productos procesados o incluso en muestras de suelo o biológicas. La leche y otros productos lácteos son matrices complejas y el proceso de limpieza tiene un papel fundamental en la eliminación de interferentes en el extracto final. La etapa de limpieza suele llevarse a cabo con PSA y sulfato magnésico. En muestras cárnicas se suele utilizar además C18 en esta etapa [18- 20].

3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

3.3.1. Aspectos generales de la Cromatografía Líquida

La cromatografía de líquidos es una técnica que se emplea para la separación de mezclas complejas. Se basa en la diferencia de afinidad que experimentan los analitos de una muestra respecto a una fase móvil y a una fase estacionaria fijada en la cara interna de una columna. La mezcla atraviesa la columna cromatográfica disuelta en un solvente que recibe el nombre de fase móvil. Al pasar a través de la columna, el tiempo de permanencia de los analitos es diferente en función del grado de interacción que presenten respecto a las fases móvil y estacionaria. Esto permite que los compuestos se separen al atravesar la columna y eluyan a tiempos diferentes.

El flujo de fase móvil es posible gracias a sistemas de bombeo capaces de generar altas presiones y producir caudales lo suficientemente rápidos como para evitar la difusión del frente de analito. La fase móvil puede estar constituida por uno o varios eluyentes, y se le pueden añadir sales, tampones u otros compuestos para mejorar la separación.

Tras atravesar la columna, los analitos pasan por un detector que genera una señal. La representación de las señales frente al tiempo se registra en lo que se denomina cromatograma. El cromatograma recoge todas estas señales en forma de picos. La resolución de los picos se podrá mejorar cambiando distintos parámetros del proceso cromatográfico, como modificando el caudal de fase móvil o introduciendo gradientes de temperatura o de composición de la fase móvil durante el análisis.

3.3.2. Clasificación en función de la polaridad

En función de la polaridad de la fase móvil y de la fase estacionaria, existen dos tipos de cromatografía líquida: en fase normal (o de adsorción) y en fase reversa (o de fase inversa).

La cromatografía en fase normal se emplea una fase estacionaria de elevada polaridad mientras que la fase móvil es de baja polaridad. Los disolventes más empleados como fase móvil son el dietil-éter, cloroformo o hexano, mientras que la fase estacionaria suele ser sílice. Estas condiciones son las óptimas para la separación de analitos polares.

En la cromatografía en fase reversa los analitos de polaridad media-alta son arrastrados por una fase móvil moderadamente polar, siendo la fase estacionaria de naturaleza apolar. La eficacia de la separación mejora al aumentar el número de carbonos del radical alquilo.

Cromatografía de líquidos en fase reversa

La cromatografía líquida en fase reversa es ideal para la separación de compuestos poco volátiles y de polaridad media-alta. La separación se produce debido a la repulsión hidrofóbica que sufren los analitos al entrar en contacto con la fase móvil polar y la fase estacionaria apolar. Como fase móvil se suelen emplear mezclas

acuosas de metanol, acetonitrilo. Los analitos que eluyen primero son aquellos con mayor polaridad.

Se puede mejorar la separación añadiendo sales a la fase móvil. De esta forma aumenta la tensión superficial y aumenta el tiempo de retención. El pH también puede influir en la separación cuando el analito puede encontrarse protonado o en su forma ionizada.

Las fases estacionarias más comunes son siloxanos con cadenas radicales de 8 o 18 carbonos (C8, C18). La longitud de la columna cromatográfica puede variar (5-25 cm), con un tamaño de partícula alrededor de los 4 μm . Para obtener mejores resultados se han desarrollado columnas con un tamaño de partícula inferiores a 2 μm . Al aumentar la superficie específica del relleno aumentan las interacciones entre el analito y la fase estacionaria mejorando la separación de la mezcla. Las ventajas son que se mejoran los tiempos de análisis y se reduce el consumo de fase móvil, dado que el caudal necesario que se necesita es menor. Sin embargo, es necesario aplicar presiones mayores para que la fase móvil atraviese la columna, lo que supone un mayor coste de la bomba para generar presiones más altas y del instrumental que sea capaz de soportarlas. Este es el caso de la cromatografía líquida de ultra-rendimiento (UPLC; *Ultra Performance Liquid Chromatography*), o la micro-cromatografía líquida.

3.3.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica de gran versatilidad que permite determinar los elementos presentes en una muestra, analizar cuantitativamente los compuestos presentes en mezclas complejas y arrojar cierta información acerca de la estructura molecular. Se fundamenta en el análisis de los fragmentos obtenidos tras ionizar la muestra y separar los distintos fragmentos en función de su relación carga-masa (m/z) para finalmente analizar la masa de cada fragmento [21].

Las principales ventajas de la espectrometría de masas son:

- Límites de detección más bajos en comparación con la mayoría de métodos espectrométricos ópticos (mayor sensibilidad).
- Espectros sencillos de interpretar.
- Capacidad para medir relaciones isotópicas atómicas de una muestra.
- Técnica muy rápida.

Sin embargo, este método de análisis también presenta inconvenientes:

- El instrumental tiene un coste elevado.
- A la hora de analizar muestras reales, hay un mayor número de analitos presentes dada la mayor complejidad de la matriz. Para simplificar el análisis, se emplea de manera conjunta con una técnica separativa, como la cromatografía de líquidos o la cromatografía de gases (LC-MS, GC-MS).

El espectrómetro de masas está constituido por tres componentes fundamentales: ionizador, analizador y detector.

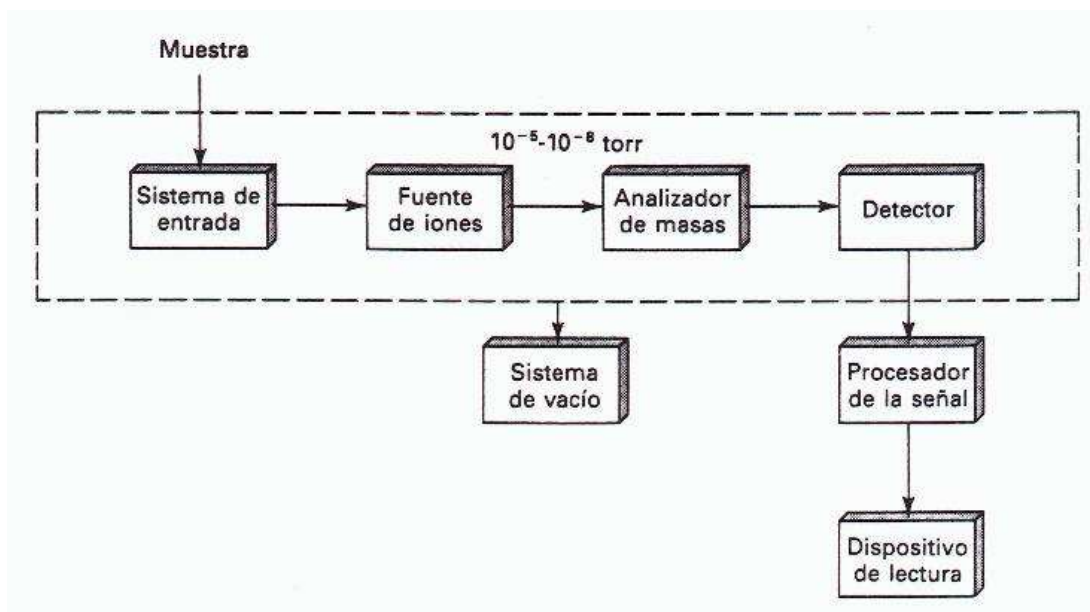


Figura 1. Esquema general de la espectrometría de masas. Imagen obtenida de: <https://mariecuriesnews.wordpress.com/category/metodos-y-tecnicas/page/4/>

Para el acoplamiento LC-MS es necesario pasar la muestra por un sistema de entrada tras atravesar la columna cromatográfica para volatilizar la muestra. Para conseguirlo se pueden emplear distintas interfaces:

- Rayo de partículas (PB, *Particle Beam*).
- Termo-spray (TSP, *Thermospray*).
- Ionización a presión atmosférica (API, *Atmospheric Pressure Ionization*).

En la PB se consigue eliminar el disolvente, mientras que en la TSP y API se elimina el disolvente y se volatilizan los analitos de forma simultánea.

A partir de este punto todo el proceso se lleva a cabo en condiciones de vacío para evitar la interacción de los iones con el aire. La muestra pasa por el ionizador para generar iones a partir de las moléculas neutras. En el analizador los iones formados se hacen pasar a través de un campo magnético que desvía la trayectoria de los iones en función de su relación m/z y los separa. Finalmente, los iones separados llegan al detector y se genera una señal que es procesada por un software para obtener el cromatograma y espectro de masas para cada señal registrada.

3.3.3.1. Fuentes de ionización

La ionización de las moléculas muestras se puede clasificar en:

- Ionización en fase gaseosa.
 - Impacto de electrones (EI, *Electron Impact*)
 - Ionización química (CI, *Chemist Ionization*)
 - Ionización por campo (FI, *Field Ionization*)
- Ionización por desorción.
 - Termospray (TSP, *Thermospray*)
 - Ionización a presión atmosférica (API, *Atmospheric Pressure Ionization*)

En la ionización en fase gaseosa se volatiliza la muestra antes de ionizarla. En la ionización por desorción las moléculas se transforman directamente en iones en estado gaseoso.

La elección de un tipo u otro dependerá del PM (peso molecular) y la estabilidad térmica del analito. Para analitos con baja estabilidad térmica y alto PM se emplea la ionización por desorción mientras que para analitos térmicamente estables y PM inferior a 1000 Dalton se utiliza la ionización en fase gaseosa.

Las fuentes de ionización también se pueden clasificar en función a la energía aplicada a la muestra durante el proceso en duras o blandas. Las fuentes de ionización duras o de mayor energía aportan información estructural mientras que las fuentes blandas o de menor energía se utilizan cuando interesa determinar la masa exacta y con ello el PM de los compuestos.

Las fuentes de ionización blandas son las empleadas en el caso de cromatografía líquida, y más concretamente las fuentes API, las cuales son las más utilizadas en la actualidad dada su gran rendimiento, eficacia y robustez respecto a otros ionizadores. En primer lugar, se suministra suficiente energía para volatilizar el disolvente e ionizar los analitos a presión atmosférica. Una vez formados los iones, se hacen pasar a través de distintas regiones aumentando el nivel de vacío de forma progresiva en cada región. Los iones son finalmente dirigidos al analizador mediante la aplicación de campos eléctricos. Los espectros obtenidos pueden corresponder al ion molecular (M^+) o al ion cuasimolecular (MH^+), en función del mecanismo empleado para la formación de iones.

Las fuentes API están constituidas por:

- 1) Nebulizador de muestra. Introduce la muestra en forma de aerosol.
- 2) Cámara de ionización. La ionización a presión atmosférica se puede producir por distintos mecanismos (APCI, ESI...)
- 3) Cono de muestreo.
- 4) Interfase entre la zona a presión atmosférica y la zona de vacío. Cuenta con un sistema que dirige los iones hacia el analizador. Este sistema puede ser un cuadrupolo, hexapolo u octopolo.
- 5) Sistema óptico de lentes que transporta los iones a la región de alto vacío.

Mecanismos de ionización en fuentes API

a) Ionización química a presión atmosférica (APCI)

La fase móvil con los analitos entra en un tubo de sílice tras atravesar la columna cromatográfica para LC. A su vez se inyecta un gas nebulizador (generalmente nitrógeno) y se eleva la temperatura del tubo entre 400 y 500 C°. A continuación, se dirige la mezcla gas-vapor hacia la región del ionizador que se encuentra a presión atmosférica. La ionización tiene lugar al aplicar una descarga en corona (2.6 kV) a la mezcla; se ionizan tanto las moléculas de analito como las de disolvente. Los iones resultantes pueden interactuar entre ellos dando lugar a reacciones de transferencia de carga y formación de *clusters*. Para disgregar los clusters se genera un flujo de

nitrógeno que actúa como cortina de gas y separa los iones. Con este método se generan iones cuasimoleculares (MH^+ , MNa^+).

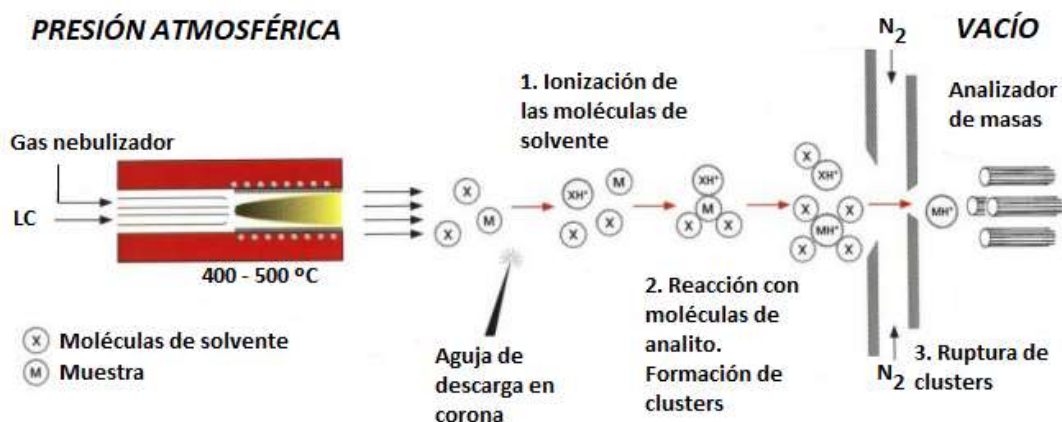


Figura 2. Esquema del proceso de ionización química a presión atmosférica. Imagen obtenida de: <https://danum74.wordpress.com/2014/05/15/espectroscopia-de-masas-2/>

b) Electrospray (ESI)

En la ionización por electrospray se hace pasar la muestra que sale de la columna de LC por un capilar metálico que se encuentra a presión atmosférica y sometida a un potencial de entre 3-4 KV. La muestra forma micro-gotas cargadas al salir del capilar (nebulización). Las microgotas se hacen pasar por otro capilar que va desde la región a presión atmosférica a la región con vacío. Durante el transporte se circulan las cargas de la superficie de las gotas que generan fuerzas repulsivas que fragmenta las gotas (fisión de Coulomb) hasta formar los iones cargados. Para terminar de eliminar el disolvente se hace pasar una corriente de nitrógeno a 350 C°.

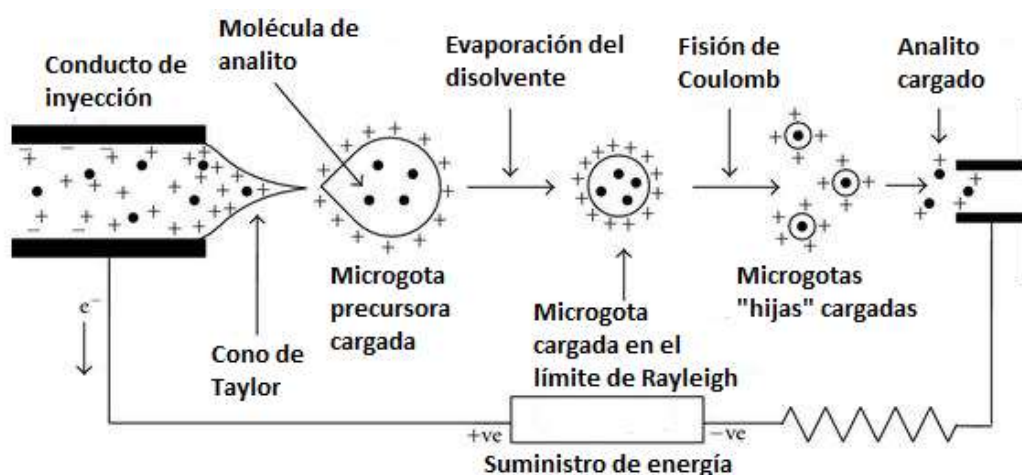


Figura 3. Esquema del proceso de ionización por electrospray. Imagen obtenida de: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process_fig25_225050758

3.3.3.2. Analizadores

Una vez formados los iones se hacen pasar a través del analizador de masas. Este instrumento tiene por objetivo separar los distintos iones en función a su relación carga/masa (m/z). Los analizadores de masas se pueden agrupar en 4 tipos:

- Analizadores de enfoque simple (magnéticos) y de doble enfoque (magnéticos y electrostáticos).
- Analizador de cuadrupolo (Q).
- Analizador de tiempo de vuelo (TOF, *Time Of Flight*).
- Analizador de trampa de iones (IT, *Ion Trap*).

La selección del analizador dependerá de la sensibilidad requerida y del objetivo del análisis.

En la espectrometría de masas en Tándem (MS/MS) se emplea el analizador de trampa de iones o sistemas de triple cuadrupolo (QqQ) en los que se realiza un acoplamiento en serie de tres cuadrupolos.

Los analizadores se clasifican en instrumentos de baja y alta resolución. Los de baja resolución tienen una elevada sensibilidad y se emplean para el análisis de compuestos objetivo. Los analizadores de alta resolución, como el TOF, aportan información incluso de la composición de la matriz y se utilizan para el análisis de compuestos desconocidos.

a) Triple cuadrupolo (QqQ)

Un cuadrupolo simple está formado por cuatro cilindros situados de forma paralela entre sí. Estas barras actúan como electrodos de manera que dos barras enfrentadas estarán conectadas a un polo positivo y las otras dos barras se conectan al polo negativo. Al entrar en el cuadrupolo los iones aumentan su energía cinética y se aceleran. Regulando las tensiones de corriente continua y alterna aplicadas a cada par de cilindros se consigue que sólo aquellos iones con una relación m/z adecuada atraviesen el cuadrupolo, mientras que el resto impactan con los cilindros.

El analizador de triple cuadrupolo está compuesto por tres cuadrupolos conectados en serie. Cada uno de ellos cumple una función específica. El primer cuadrupolo (Q1) y el tercero (Q3) actúan como filtros, seleccionando aquellos iones de interés en función de su relación m/z . El segundo cuadrupolo (Q2) actúa como celda de colisión donde se fragmentan los iones precursores seleccionados en el Q1 para obtener los iones producto (o transiciones) característicos del compuesto. El proceso de fragmentación que tiene lugar se denomina “Disociación Inducida por Colisiones” (CID, *Collision-Induced Dissociation*). En ella se introduce un gas de colisión (He, Ar) y los iones que entran impactan con las moléculas de gas generando fragmentos más pequeños (iones producto o transiciones). Los iones producto se hacen pasar por el Q3 y se seleccionan las dos transiciones de mayor intensidad para realizar análisis cuantitativo y cualitativo.

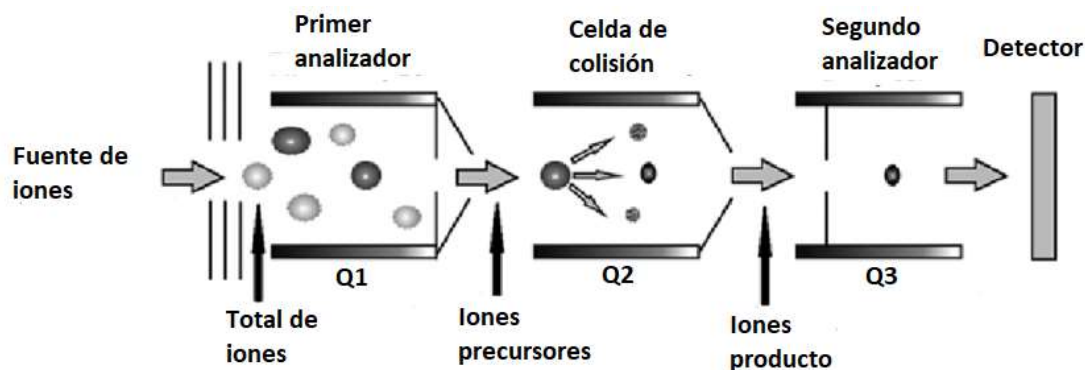


Figura 4. Analizador de masas de triple cuadrupolo (QqQ). Imagen obtenida de: https://www.researchgate.net/figure/Schema-of-mass-spectrometry-analysis-in-SRM-mode-triple-quadrupole-QqQ-mass_fig3_236197462

4. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es llevar a cabo un estudio de monitoreo de residuos de pesticidas en 111 muestras ecológicas representativas, procedentes de diferentes países y de diferentes grupos de productos alimenticios, mediante cromatografía de líquidos acoplada a MS en tándem (LC-QqQ-MS/MS) y empleando métodos analíticos validados, altamente sensibles.

Asimismo, se fijaron objetivos específicos con el fin de llevar a cabo la evaluación de los resultados obtenidos:

- Determinar el porcentaje de muestras que contienen residuos de pesticidas por encima del LOQ.
- Identificar las matrices en las que se detectan un mayor número de pesticidas.
- Identificar los pesticidas que se encuentran en un número mayor de matrices.
- Estudiar el porcentaje de muestras con niveles de residuos de pesticidas superiores al LMR.

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Un conjunto de 190 pesticidas multiclase (listados en el Anexo I) empleados en fruta y verduras fue seleccionado para el estudio. Los estándares de alta pureza de pesticidas fueron suministrados por el Dr. Ehrentorfer (LCG Standards, Middlesex, UK) y Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y se almacenaron a -20°C . Las disoluciones patrón individuales (1000-2000 mg/l) se prepararon en acetonitrilo y fueron almacenadas a -20°C .

El acetonitrilo de grado-HPLC y el ácido fórmico (98%) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El agua de grado LC-MS se obtuvo de

Fischer Scientific (Geel, Bélgica). Los adsorbente Amina Primaria-Secundaria (PSA) *Bond Elut* y *Z-Sep* provenían de Supelco (Bellefonte, PS, USA). El cloruro sódico fue adquirido de J.T.Baker (Deventer, Países Bajos). El hidrogencitrato disódico sesquihidratado y el cloruro cálcico fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El sulfato magnésico anhidro fue obtenido de Panreac (Barcelona, España). El C18, *Bond Elut Enhanced Matriz Removal d-SPE* y el *Bond-Elut Final Polish* provenían de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Para las etapas de agitación se utilizó un extractor axial automático suministrado por AGYTAX®, Cirta Lab. S.L. (España). Para la trituration de muestras se utilizó una trituradora Thermomix®.

5.2. ANÁLISIS MEDIANTE LC-QqQ-MS/MS

Para este estudio se empleó un cromatógrafo Agilent UPLC 1290 Series (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 6490 TripleQuad LC/MS. El UPLC estaba equipado con una columna analítica de fase-reversa 2.1 mm x 100 mm y 1.8 mm de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El gradiente de elución de LC se llevó a cabo con ácido fórmico 0.1%, formiato amónico 5mM y agua ultrapura al 5% en metanol como fase móvil A y ácido fórmico 0.1%, formiato amónico 5mM y metanol al 5% en agua ultrapura como fase B. La composición de la fase móvil fue la siguiente: 20% A (2 min), 13 min de gradiente lineal hasta 100% de fase A (3 min), 2.5 min de gradiente lineal hasta condiciones iniciales. El caudal fue de 0.3 mL min⁻¹ y el volumen de inyección 5 µL. El espectrómetro de masas en tandem de triple cuadrupolo de Agilent Technologies (Santa Clara, CA) estaba equipado con una fuente de ionización por electro-spray (ESI) operando en modo de ionización positivo y utilizando el modo de adquisición DMRM (de sus siglas en inglés *dynamic multi-reaction monitoring*) con una ventana de tiempos de retención de 0.8 min. Los parámetros para la fuente ESI son una temperatura del gas de 120 °C y caudal de flujo de 13 L min⁻¹. Voltaje del capilar 3000 V, voltaje del inyector 300 V; nebulizador, 45 psi; temperatura del *sheath gas*, 357 °C; flujo del *sheath gas*, 10 L min⁻¹. Los parámetros de la fuente fueron: a alta presión RF 150 V y a baja presión RF 60 V. Se empleó nitrógeno como nebulizador y gas de colisión. La adquisición y tratamiento de datos fueron realizados con el software Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis (v. B.08 y B.07).

5.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La preparación de muestras se llevó a cabo siguiendo el documento *Codex Alimentarius*⁷ en el que se indica cuáles son las partes de interés de cada fruta u hortaliza, y a las que se les realiza el control de pesticidas. Se operó tomando porciones de varias piezas de una misma muestra para asegurar la representatividad de la muestra de laboratorio.

(7) PARTE DEL PRODUCTO A LA QUE SE APLICAN LOS LIMITES MAXIMOS DEL CODEX PARA RESIDUOS Y QUE SE ANALIZA CAC/GL 41-1993.

El proceso de trituración y conservación se llevó a cabo con limpieza rigurosa, lavando adecuadamente con agua y metanol cada utensilio que se puso en contacto con las muestras, y secándolo bien antes de preparar la siguiente muestra, con el fin de evitar contaminación cruzada.

Para obtener una muestra representativa se trituró la matriz hasta que quedó completamente homogénea con la ayuda de una trituradora Thermomix[®], aumentando la velocidad progresivamente hasta el máximo conforme se iba reduciendo el tamaño de la muestra.

No fue necesaria la etapa de trituración y homogenización para las muestras de aceites, té y especias. Para la muestra de aguacate se retiraron y pesaron los huesos aparte antes de triturar.

5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

5.4.1. Extracción de pesticidas en frutas y verduras con bajo contenido en grasas (QuEChERS citrato)

Se pesaron 10 g de muestra en un tubo de teflón de 50 mL, se adicionaron 10 mL de acetonitrilo y 10 μ L de estándar interno a 10mg/l que contenía los compuestos diclorvos-d6, malatión-d10 y carbendazima-d3, con el fin de controlar la etapa de extracción [12]. A continuación, la mezcla se agitó durante 2 min en un extractor axial automático (AGYTAX[®], Cirta Lab. S.L., Spain). Se añadieron 4 g de sulfato magnésico anhidro, 1 g de cloruro sódico, 1 g de citrato trisódico dihidrato y 0.5g de hidrogencitrato disódico sesquihidrato. Se agitó durante 2 min y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Se tomó una alícuota de 5 mL del sobrenadante y se añadió en un tubo de teflón de 15 mL que contenía las sales de limpieza: 750 mg de sulfato magnésico y 120 mg de PSA. Se agitó con vortex durante 30 segundos y se centrifugó 5 min a 3500 rpm. Por último, se tomó el sobrenadante para obtener el extracto de la muestra con los pesticidas y se le añadió 40 μ L de ácido fórmico al 5% a los 4 mL de extracto obtenido. Para la preparación de la alícuota que se analizó por UPLC-MS/MS se preparó una dilución 1:4 (v/v) del extracto añadiendo 100 μ L del mismo sobre en un vial con 400 μ L de agua ultrapura. Antes de la inyección también fue necesario añadir a los viales 10 μ L de dimetoato-d6 a 2.5mg/l como estándar interno de inyección.

5.4.2. Extracción de pesticidas en muestras de aceite

Para llevar a cabo la extracción de pesticidas en muestras de aceite se aplicó el método QuEChERS con tampón citrato, al que se le añadió una etapa extra de limpieza [15]. Se pesaron 15 g de aceite de oliva en un tubo de teflón de 50 mL, se añadieron 15 mL de acetonitrilo y 15 μ L de estándar interno a 10 mg/l que contenía los compuestos diclorvos-d6, malatión-d10 y carbendazima-d3, con el fin de controlar la etapa de extracción. Los tubos se agitaron durante 4 min en un extractor axial automático (AGYTAX[®], Cirta Lab. S.L., Spain). Pasado ese tiempo se añadieron 6 g de sulfato magnésico anhidro, 1.5 g de cloruro sódico, 1.5 g de citrato tribásico dihidrato, 0.75 g de hidrogencitrato dibásico sesquihidrato, y se volvió a agitar en el extractor axial automático durante 4 min. Una vez pasado ese tiempo se

centrifugó la muestra durante 5 min a 3500 rpm y se transfirieron 8 mL del sobrenadante en un tubo de teflón de 15 mL. Los tubos con el extracto se introdujeron en hielo seco durante 6 min para provocar la precipitación de las grasas. El sobrenadante (5 mL) se transfirió a un tubo de 15 mL con 1 g de sorbente *EMR-Lipid (d-SPE)* y 5 mL de agua en su interior. Se agitó el contenido del tubo con ayuda de un vortex durante 1 min y después se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Del extracto obtenido se tomaron 5 mL y se transfirieron a un tubo *EMR-lipid polish* que contenía 2 g de una mezcla de cloruro sódico y sulfato magnésico (1:4 m/m). Con ayuda del vortex, se agitó el contenido del tubo durante 1 min y se centrifugó en las condiciones anteriormente citadas. Tras esto, se transfirieron 2 mL del extracto a un vial y se acidificó con 2 μ L ácido fórmico al 5% en acetonitrilo. Finalmente, para la preparación de la alícuota que se analizó por UPLC-MS/MS se preparó una dilución 1:4 (v/v) del extracto añadiendo 100 μ L del mismo sobre en un vial con 400 μ L de agua ultrapura. Antes de la inyección también fue necesario añadir a los viales 10 μ L de dimetoato-d₆ a 2.5 mg/l como estándar interno de inyección.

5.4.3. Extracción de pesticidas en frutas y verduras con alto contenido en grasas (aguacate)

Para llevar a cabo la extracción de pesticidas en muestras de aguacate se pesaron 10 g de muestra en un tubo de teflón de 50 mL, se añadieron 10 mL de acetonitrilo y 50 μ L de estándar interno a 10 mg/l que contenía los compuestos diclorvos-d₆, malatión-d₁₀ y carbendazima-d₃, con el fin de controlar la etapa de extracción [16]. La mezcla resultante se agitó durante 4 min con la ayuda de un extractor axial automático (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain). Posteriormente se añadieron 4 g de sulfato magnésico, 1 g de cloruro sódico, 1 g de citrato trisódico dihidrato y 0.5 g de hidrogencitrato disódico sesquihidrato para la etapa de extracción. La mezcla resultante se agitó con el extractor axial automático durante 4 min, y después se centrifugó a 3700 rpm durante 5 min. Tras esto se tomaron 5 mL de sobrenadante y se llevaron a un tubo de teflón de 15 mL que contenía 750 mg de sulfato magnésico y 125 mg de Z-Sep. La mezcla se agitó durante 30 segundos con ayuda de un vortex y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones antes descritas de tiempo y revoluciones. Del extracto obtenido se tomaron 200 μ L y se evaporaron con la ayuda de una corriente de nitrógeno. Se añadieron 150 μ L de acetonitrilo y se agitó con el vortex. Después se añadió agua ultrapura hasta un volumen total de 500 μ L, y se agitó de nuevo en vortex. Antes de la inyección en columna se hizo pasar el contenido del vial a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro 0.45 μ L (Millex FG, Millipore, Milford, MA, USA). Finalmente se añadieron 10 μ L de dimetoato-d₆ a 2.5 mg/l como estándar interno de inyección. Llevando a cabo este método, 1 mL de extracto de aguacate obtenido equivale a 0.5 g de muestra.

5.4.4. Extracción de pesticidas en muestras de té

Las muestras de té se caracterizan principalmente por su bajo contenido en agua. Por ello es necesario utilizar una variante del método QuEChERS citrato [17].

Se pesaron 2 g de muestra en un tubo de teflón de 50 mL, se añadieron 4 mL de agua mili-Q y se agitó la mezcla con ayuda de un vortex durante 30 segundos. Para hidratar la muestra y favorecer así la extracción de los pesticidas se dejó reposar durante 30 min. Pasado este tiempo se añadieron 10 mL de acetonitrilo, y 10 μ L de

estándar interno a 10 mg/l que contenía los compuestos diclorvos-d6, malatión-d10 y carbendazima-d3, con el fin de controlar la etapa de extracción. Se agitó la mezcla durante 7 min en extractor axial automático (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain). Pasado ese tiempo se añadieron las sales de extracción: 4g de sulfato magnésico, 1 g de cloruro sódico, 1 g de citrato trisódico dihidrato y 0.5g de hidrogencitrato trisódico sesquihidrato. Se volvió a agitar el tubo 7 min con extractor axial automático y se centrifugó durante 5 min a 3700 rpm. Una vez centrifugada la muestra se tomaron 3 mL del sobrenadante y se añadieron a un tubo de teflón de 15 mL que contenía las sales de limpieza: 150 mg de cloruro cálcico anhidro y 150 mg de PSA. Se agitó el contenido del tubo en vortex durante 30 segundos y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores. Se añadieron 30 µL de ácido fórmico al 5% en acetonitrilo sobre el extracto obtenido. Antes de la inyección, el extracto se filtró con ayuda de un filtro de PTFE con un tamaño de poro 0.45 µL (Millex FG, Millipore, Mildford, MA, USA). Se tomó una alícuota de 100 µL para la inyección, se secó en el vial con una corriente de nitrógeno y se reconstituyó con acetonitrilo en una proporción 1:9 v/v (acetonitrilo:agua). Finalmente se añadieron 10 µL de dimetoato-d6 a 2.5mg/l como estándar interno de inyección. Aplicando este método, 1 mL del extracto obtenido representa 0.2 g de muestra.

5.4.5. Extracción de pesticidas en muestras de especias

Se pesaron 2 g de muestra en un tubo de teflón de 50 mL. Se añadieron 7 mL de agua mili-Q para hidratar la muestra y se dejó reposar durante 30 min. Pasado este tiempo se añadieron 10 mL de acetonitrilo y se agitó la mezcla durante 7 min con ayuda de un extractor axial automático (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain). A continuación, se añadieron las sales de extracción: 4 g de sulfato magnésico anhidro, 1 g de cloruro cálcico, 1 g de citrato trisódico dihidrato, y 0.5 g de hidrogencitrato disódico sesquihidrato, y se agitó la mezcla con extractor axial automático durante 7 min. Una vez agitada la mezcla, se centrifugó a 3700 rpm durante 5 min. El extracto se transfirió a un tubo *EMR-lipid* activado previamente con mL de agua mili-Q. Los extractos se agitaron con vortex durante 30 segundos y centrifugados a 3700 rpm durante 5 min. Tras centrifugar se transfirieron 5 mL del sobrenadante a un tubo *EMR-polish* que contenía 1 g de cloruro sódico y 4 g de sulfato magnésico. Se tomó una alícuota de 100 µL para la inyección, se secó en el vial con una corriente de nitrógeno y se reconstituyó con acetonitrilo en una proporción 1:9 v/v (acetonitrilo:agua). Finalmente se añadieron 10 µL de dimetoato-d6 de 2.5mg/l a los viales antes de la inyección.

5. 5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Los métodos aplicados en este trabajaron fueron anteriormente validados en el laboratorio siguiendo las guía europeas de control de calidad y validación de métodos⁸. Los parámetros analíticos evaluados en cada una de las matrices representativas fueron los siguientes: recuperaciones, precisión, linealidad, efecto matriz y límite de cuantificación. Las recuperaciones se estudiaron fortificando

(8) Document SANTE/11813/2017. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.

muestras blancas a dos niveles de concentración y analizándolas por quintuplicado. Se consideraron aceptables recuperaciones medias entre el 70 y el 120%, tal y como especifica la guía SANTE/11813/2017. La repetibilidad se calculó como la desviación estándar relativa de los cinco análisis de recuperación a los dos niveles de concentración. Se consideraron satisfactorios valores de DER inferiores al 20%.

La linealidad se evaluó mediante el análisis de rectas de calibrado en matriz y en disolvente, con cinco niveles de concentración. Asimismo, mediante la comparación de las pendientes de sendas rectas en disolvente y en matriz se estudió el efecto matriz.

Finalmente se evaluó el límite de cuantificación (LOQ) como la concentración más baja a la cual el método analítico ha sido satisfactoriamente validado. En los métodos aplicados, el LOQ para frutas y hortalizas con alto contenido en agua y alto contenido en agua y ácido fue de 0.005 mg/kg, para aceites, aguacate y té era de 0.010 mg/kg y para especias era de 0.025 mg/kg.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la elaboración de este trabajo se analizaron 111 muestras procedentes de distintos países de la Unión Europea, Asia y de Latinoamérica, aunque la gran mayoría procedían de distintas regiones de España (Anexo II).

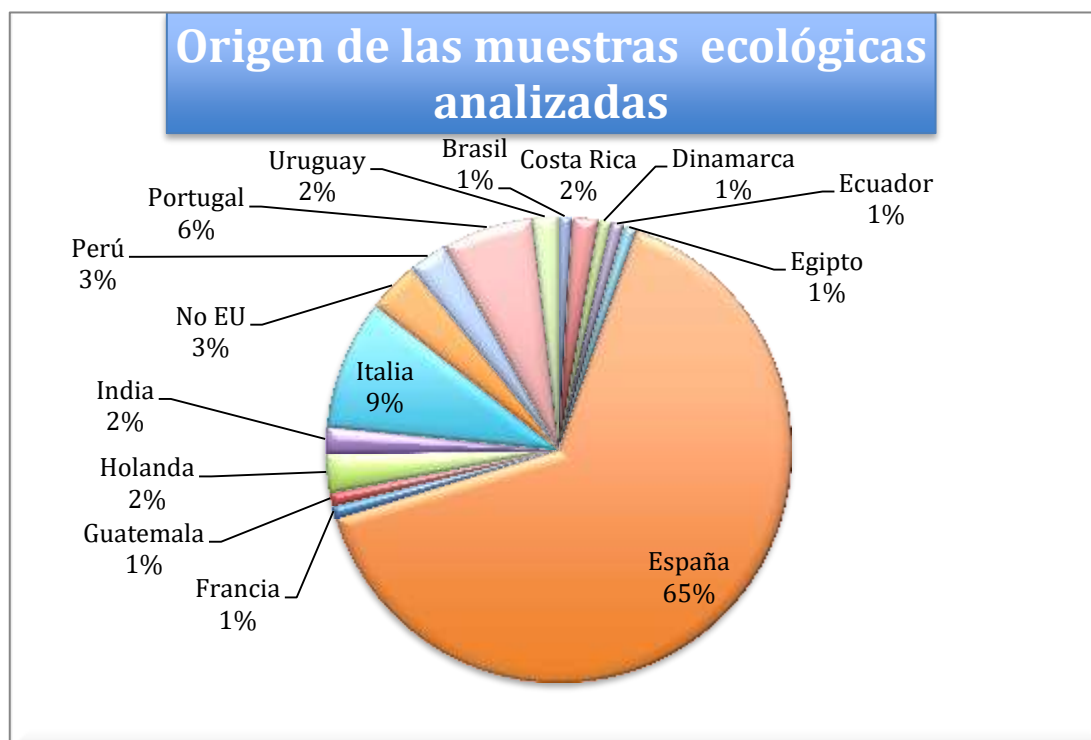


Figura 5. Procedencia de las muestras.

Las muestras ecológicas utilizadas para este estudio pertenecían a distintas categorías dentro de la clasificación de materias primas de la guía SANTE/11813/2017. La mayor parte (69%) pertenecía al grupo de alimentos con un alto contenido en agua (tomate, pera, manzana...). Un 14% presentaban matrices muy secas, siendo

necesario hidratar la muestra tras homogenizar. Un 6% lo constituían aquellas matrices con un alto contenido en ácidos grasos como muestras de aceite o aguacate, y el 11% restante lo conformaban aquellas muestras con alto contenido en ácido y agua, como la frambuesa.



Figura 6. Clasificación de las muestras según su composición.

El método empleado contenía un total de 190 pesticidas diferentes (Anexo I). Los LOQs se establecieron, tal y como se indica en el apartado 5.5 de validación del método en función de la naturaleza de la matriz. La Tabla 1 recoge los LOQs de los plaguicidas analizados según el tipo de muestra.

Tipo de muestra	LOQ (mg/kg)
Alto contenido en agua y alto contenido en agua y ácido	0.005
Alto contenido en aceite y contenido moderado en agua	0.010
Aceite	0.010
Té	0.010
Espicias	0.025

Tabla 1. Límites de cuantificación establecidos en función del tipo de matriz.

Teniendo en cuenta el LOQ correspondiente para cada tipo de matriz, un 14% de las muestras mostraba niveles de pesticidas por encima del LOQ. De ese porcentaje, únicamente un 1% presentaba residuos de pesticidas permitidos en la agricultura ecológica (espinosin A y D). La tabla 2 y la figura 7 recogen los resultados de las muestras que contenían residuos de plaguicidas por encima del LOQ.

Azoxystrobin						0.035						0.016			
Boscalid	0.007	0.008													
Chlorpyrifos			0.101								0.007				
Fludioxinil	0.043	0.050					0.007								
Fluazifop														0.030	
Imidacloprid								0.066							
Mandipropamid															0.028
MCPA								0.060							
Phosalone			0.032												
Phosmet												0.015			
Prothioconazole-desthio														0.030	
Pyrimethanil	0.008	0.008													
Quinoxifen														0.031	
Spinetoram				0.137	0.008					0.025					
Spinosin A				0.105					0.006	0.019					
Spinosin D				0.112	0.009				0.007	0.024					
Tebuconazole			0.025												
	1	2	4	21	22	33	38	42	54	72	88	92	101	106	107

Numeración	Pesticida	Numeración	Pesticida	Numeración	Pesticida
1	Manzana	33	Ajo	88	Boniato
2	Manzana	38	Piña	92	Ajo
4	Cayena	42	Tomillo	101	Aceite de oliva
21	Pera	54	Pera	106	Orégano
22	Espinacas	72	Plátano	107	Perejil

Tabla 2. Tabla de resultados positivos con las concentraciones de residuos en mg/kg. En rojo están aquellos valores que superan el LMR.

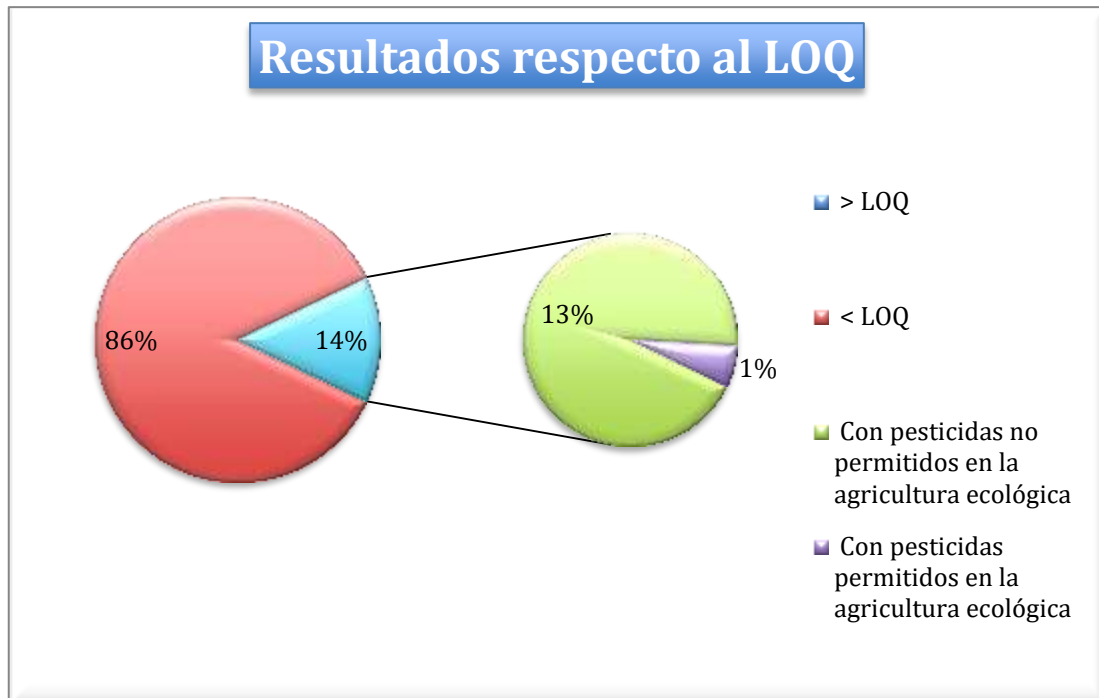


Figura 7. Porcentaje de muestras con residuos de pesticidas por encima de los LOQ

Las matrices en la que se detectaron un mayor número de pesticidas fueron 1-manzana, 2-manzana, 4-cayena, 21-pera, 72-plátano y 107-perejil, procedentes de Portugal, la India y España, en las que se pudieron cuantificar un total de tres pesticidas diferentes en cada una de ellas. En las muestras de 22-espinacas, 42-tomillo y 54-pera se detectaron dos pesticidas que superaban el LOQ en cada una de ellas.

El método empleado analizaba un total de 190 pesticidas diferentes (Anexo I). De los 190, 19 estaban presentes en el conjunto de matrices analizadas. Diez de estos pesticidas se detectaron en más de una muestra.

El chlorpirifos, un insecticida ampliamente utilizado para el control de plagas, fue el compuesto detectado con mayor frecuencia durante los análisis, el cual fue identificado en cinco de las muestras (88-boniato, 42-tomillo, 4-cayena, 106-orégano y 101-aceite de oliva).

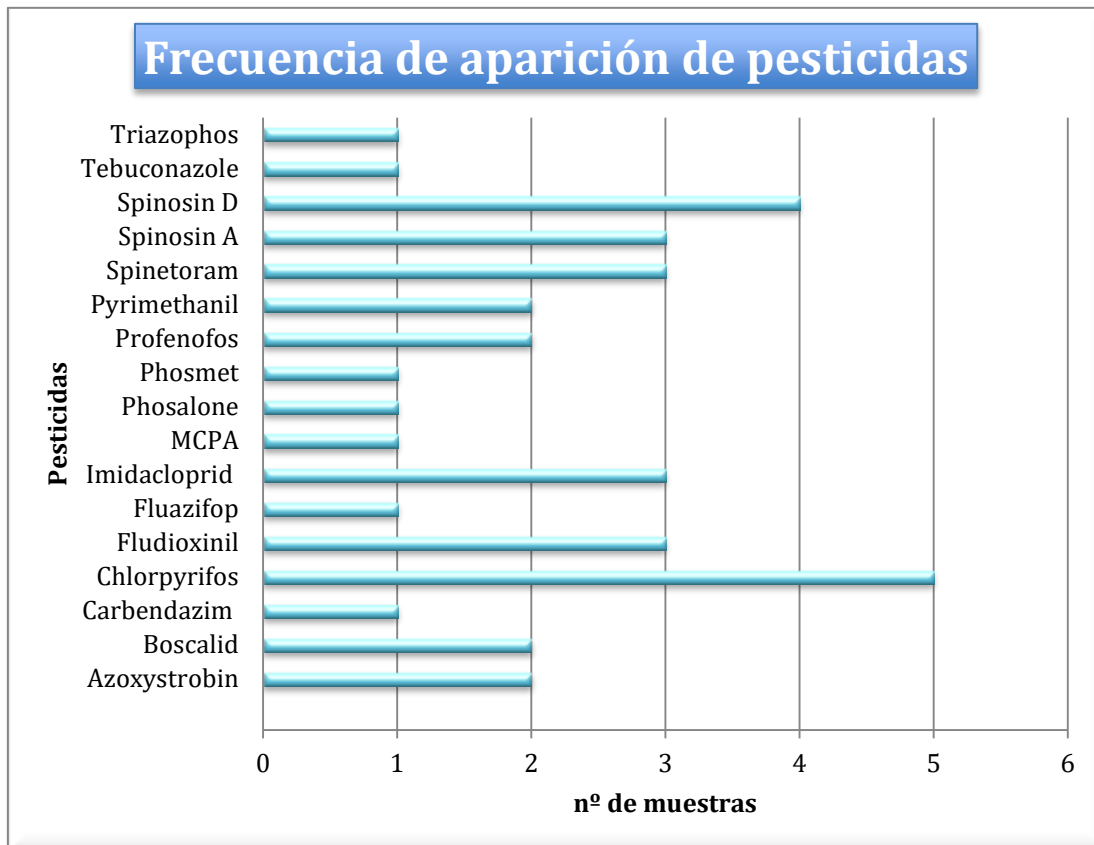


Figura 8. Frecuencia de aparición de los pesticidas detectados.

Respecto a los pesticidas permitidos en la agricultura ecológica, se encontraron residuos de espinosin A y espinosin D en las muestras 21-pera, 54-pera, 22-espinacas y 72-plátano (ver Anexo III).

En las muestras de tomillo, orégano y perejil, las concentraciones encontradas de algunos pesticidas no sólo superaban el LOQ sino que también se encontraban por encima del LMR establecido en la Unión Europea en esas matrices.

Muestra	Pesticida	Concentración (mg/kg)	LMR (mg/kg)
42-tomillo	Imidacloprid	0.065	0.050
	MCPA	0.060	0.050
106-orégano	Fluazifop	0.030	0.020
107-perejil	Prothioconazole-desthio	0.030	0.020
	Quinoxifen	0.031	0.020

Tabla 3. Pesticidas que superan los LMRs.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la mayoría de las muestras analizadas (un 86%) no contienen residuos de pesticidas por encima de los LOQs del método, lo que hace suponer que esas muestras se han cultivado en las condiciones propias de los sistemas de producción ecológica. Sin embargo, se pudo constatar la presencia de residuos de pesticidas en un 14% de los productos ecológicos analizados. La mayoría de ellos presentaban concentraciones notablemente por debajo de los LMRs establecidos en la Unión Europea, con niveles de concentración entre 0.005 mg/kg y 0.030 mg/kg, aunque en tres de las muestras se detectaron cinco plaguicidas a concentraciones que superaban estos límites. Los plaguicidas que se encontraron en un mayor número de muestras fueron Clorpirifos (5% de las muestras) y Espinosin D (4% de las muestras). El porcentaje de muestras que contenían residuos de pesticidas en concentraciones superiores al LMR fue del 3%.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Douglas P., Robertson S., Gay R., Hansell, A., Gant T. *A systematic review of the public health risks of bioaerosols from intensive farming*. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2018; 221(2), pp.134-173.
2. Ramos e Silva C., Sternberg L., Dávalos P.; Souza F. *The impact of organic and intensive farming on the tropical estuary*. Ocean & Coastal Management. 2017; 141:55-64.
3. Young S. *A systematic review of the literature reveals trends and gaps in integrated pest management studies conducted in the United States*. Pest Management Science. 2017; 73(8):1553-1558.
4. Tirado, R. (2015). *Ecological Farming. The seven principles of a food system that has people at its heart*. [Internet]. Fecha de publicación: Mayo 2015. Disponible en:
https://www.greenpeace.org/austria/Global/austria/dokumente/Reports/Landwirtschaft/Landwirtschaft_ecological_farming_EN_2015.pdf
5. Brantsæter A., Ydersbond T., Hoppin J., Haugen M., Meltzer H. *Organic Food in the Diet: Exposure and Health Implications*. Annual Review of Public Health. 2017; 38(1):295-313.
6. *Monitoring data on pesticide residues in food: results on organic versus conventionally produced food*. EFSA Supporting Publications. 2018; 15(4).
7. Tiryyaki O. *Pesticide Residues and Organic Production*. J BIOL ENVIRON SCI [Internet]. Fecha de publicación: 16 Mayo 2017; 11(31):11-23. Disponible en:
<https://pdfs.semanticscholar.org/814f/1a338b12f2f279a15fa45755d1cf7972be64.pdf>
8. Tobin R. *Detection of Pesticide Residues in Organic and Conventional Fruits and Vegetables Available in Ireland Using Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS) and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Detection*. Journal of Nutritional Health & Food Science. 2014; 2(1).
9. Johansson E., Hussain A., Kuktaite R., Andersson S., Olsson M. *Contribution of Organically Grown Crops to Human Health*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2014; 11(4):3870-3893.
10. Anastassiades M., Lehotay S. *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce*. Journal of AOAC International. 2003; 86(2).

11. J. Lehotay S., Mastovska K., R. Lightfield A. *Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables*. Journal of AOAC International. 2005; 88(2):615-629.
12. *A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products*. [Internet]. Disponible en:
<http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>
13. Lehotay, S.J., Anastassiades M., Majors R. *The QuEChERS revolution*. LC GC Europe. 2010. 23.
14. Oshita D., Jardim, I. *Comparison of Different Sorbents in the QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Strawberries by LC-MS/MS*. Chromatographia. 2014; 77(19-20): 1291-1298.
15. Dias J., Cutillas V., Lozano A., Pizzutti I., Fernández-Alba A. *Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up*. Journal of Chromatography A. 2016; 1462:8-18.
16. Rajska Ł., Lozano A., Uclés A., Ferrer C., Fernández-Alba A. *Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 2013; 1304:109-120.
17. Lozano A., Rajska Ł., Belmonte-Valles N., Uclés A., Uclés S., Mezcua M. et al. *Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples*. Journal of Chromatography A. 2012; 1268:109-122.
18. Saint-Hilaire M., Inthavong C., Bertin T., Lavison-Bompard G., Guérin T., Fournier A. et al. *Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers*. Food Chemistry. 2018; 252:147-153.
19. da Costa Morais E., Collins C., Jardim I. *Pesticide determination in sweet peppers using QuEChERS and LC-MS/MS*. Food Chemistry. 2018; 249:77-83.
20. Golge O., Koluman A., Kabak B. *Validation of a Modified QuEChERS Method for the Determination of 167 Pesticides in Milk and Milk Products by LC-MS/MS*. Food Analytical Methods. 2017; 11(4):1122-1148.
21. A. Skoog Douglas., James Holler F., A. Nieman, Timothy. *Principios de Análisis Instrumental*. 5th ed. Madrid: Concepción Fernández Madrid. 2001; 269-278.

9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

QuEChERS	“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe” [Rápido, Fácil, Económico, Eficaz, Sólido y Seguro]
LMR	Límite Máximo de Residuo
CIP	Control Integrado de Plagas
MIP	Manejo Integrado de Plagas
EFSA	“European Food Safety Authority” [Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria]
CE	Comisión Europea
UE	Unión Europea
ACN	Acetonitrilo
PSA	“Primary and Secondary Amine” [Amina Primaria Secundaria]
LC/MS	“Liquid Chromatography- Mass Spectrometry” [Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas]
UPLC-MS/MS	“Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry” [Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem]
SPE	“Solid Phase Extraction” [Extracción en Fase Sólida]
PTFE	Politetrafluoroetileno
UPLC	“Ultra Performance Liquid Chromatography” [Cromatografía Líquida de Ultra-Rendimiento]
PB	“Particle Beam” [Rayo de Partículas]
TSP	“Thermospray” [Termospray]
API	“Atmospheric Pressure Ionization” [Ionización a Presión Atmosférica]
EI	“Electron Impact” [Impacto Electrónico]
CI	“Chemical Ionization” [Ionización Química]
FI	“Field Ionization” [Ionización por Campo]
PM	Peso molecular
APCI	“Atmospheric Pressure Chemical Ionization” [Ionización Química a Presión Atmosférica]
ESI	“Electrospray Ionization” [Ionización por Electrospray]
TOF	“Time Of Flight” [Tiempo de Vuelo]
IT	“Ion Trap” [Trampa de Iones]
CID	“Collision-Induced Dissociation” [Disociación Inducida por Colisiones]

ANEXOS

ANEXO I: PLAGUICIDAS, TIEMPOS DE RETENCIÓN E IONES MONITORIZADOS EN EL MÉTODO DE ANÁLISIS MEDIANTE LC-MS/MS

Compuesto	Tiempo de retención (min)	SRM 1	CE1 (V)	SRM 2	CE2 (V)
2,4-D	9.4	219>161	15	221>163	15
Acephate	1.5	184>143	5	184>125	15
Acetamiprid	5.7	223>126	20	223>56	15
Aldicarb	7.3	213>116	10	213>89	15
Aldicarb-sulfone	2.3	223>148	5	223>86	10
Aldicarb-sulfoxide	1.8	207>132	5	207>89	10
Azinphos-methyl	10.2	318>261	0	318>132	8
Ametoctradin	12.9	276>176	35	276>149	35
Azoxystrobin	13.6	404>372	10	404>344	20
Avermectin B1a	14.5	890>305	15	890>567	10
Avermectin B1b	14.3	876>553	15	876>291	15
Bifenazate	11.4	301>198	10	301>170	20
Bitertanol	12.6	338>269	5	338>99	10
Boscalid	10.9	343>307	16	343>272	32
Bromuconazole	11.3	378>159	20	378>70	20
Bupirimate	11.6	317>272	20	317>166	20
Buprofezin	13.5	306>201	10	306>116	15
Carbaryl	8.8	202>145	10	202>127	20
Carbendazim	3.1	192>160	15	192>132	20
Carbendazim-d3 (I.S)	3.1	195>160	20	195>132	20
Carbofuran	8.5	222>165		222>123	
Chlorantraniliprol	10.3	484>453	16	484>286	8
Chlorfenvinphos	12.5	359>155	8	359>99	28
Chlorpyrifos-methyl	12.7	322>290	14	322>125	16
Chlorpyrifos	13.6	352>	20	350>198	20
Clofentezin	12.4	303>138	12	303>102	40
Cinerin I	14.2	317>149	5	317>107	10
Cinerin II	11.9	361>107	20	361>301	15
Clomazone	10.4	240>128	10	240>125	20
Coumaphos	12.5	363>307	20	363>227	28
Cyazofamid	11.8	325>261	10	325>108	15
Cymoxanil	6.1	199>128	4	199>111	12
Cyproconazole	11.5	292>125	32	292>70	16
Cyprodinil	11.6	226>93	40	226>77	40
Cyromazine	1.1	167>125	15	167>60	20
Dazomet	2.52	163>120	10	163>90	5

DEET	9.9	192>119	15	192>91	20
Demeton-S-methylsulfone	3.48	263>169	12	263>109	24
Demeton-S-methylsulfoxide	3.1	247>169	8	247>109	24
Diazinon	12.5	305>169	15	305>153	20
Diclorvos	8.4	221>109	15	221>79	30
Diclorvos-d6 (I.S)	8.3	227>133	20	227>115	20
Dicrotophos	4.7	238>112	8	238>115	28
Diethofencarb	10.6	268>226	5	268>180	15
Difenoconazole	12.8	406>337	15	406>251	20
Diflubenzuron	11.8	311>158	8	311>141	32
Dimethoate	5.7	230>199	5	230>171	10
Dimethoate-d6 (I.S)	5.6	236>205	4	236>131	16
Dimethomorph	11.1	388>301	20	388>165	20
Diniconazole	12.9	326>159	28	326>70	28
Dithianon	10.8	296>264	20	296>164	30
Diuron	9.9	233>72	20	233>160	20
Dodine	12.5	228>60	20	228>57	20
Emamectin B1a	13.3	887>158	40	887>302	35
Emamectin B1b	13.0	872>158	30	872>82	35
EPN	12.9	324>296	10	324>157	20
Epoxiconazole	11.7	330>121	16	330>101	52
Ethion	13.7	385>199	5	385>171	10
Ethirimol	7.2	210>140	20	210>43	52
Ethoprophos	11.8	243>131	15	243>97	30
Etofenprox	14.9	394>177	8	394>107	40
Etoxazole	14.0	360>141	30	360>304	20
Famoxadone	12.4	392>331	10	392>238	20
Fenamidone	10.9	312>92	28	312>65	56
Fenamiphos	12.0	304>234	12	304>217	20
Fenamiphos-sulfone	8.9	336>266	16	336>188	24
Fenamiphos-sulfoxide	8.6	320>292	8	320>108	44
Fenarimol	11.7	331>268	20	331>259	20
Fenazaquin	14.3	307>161	15	307>147	15
Fenbuconazole	11.8	337>125	40	337>70	33
Fenhexamid	11.6	302>97	25	302>55	30
Fenoxycarb	11.9	302>116	5	302>88	20
Fenpropathrin	14.2	350>125	10	350>97	32
Fenpropimorph	10.5	304>147	30	304>130	25
Fenpyrazamine	11.5	332>272	10	332>230	20
Fenpyroximate	14.1	422>366	12	422>107	64
Fenthion	12.2	279>247	8	279>169	12

Fenthion-sulfone	9.1	311>125	15	311>108	15
Fenthion-sulfoxide	8.86	295>280	16	295>109	32
Fipronil	12.1	435>330	12	435>250	28
Fonicamid	3.5	230>174	10	230>203	10
Fluazifop	10.8	328>282	15	328>254	20
Flubendiamide	12.4	681>274	15	681>254	20
Fludioxonil	11.0	247>169	32	247>152	32
Flufenacet	11.8	364>194	15	364>152	15
Flufenoxuron	13.9	489>158	20	489>141	56
Fluopyram	11.6	397>208	20	397>173	20
Fluquinconazole	11.4	376>307	24	376>108	56
Flusilazol	12.0	316>247	12	316>165	24
Flutriafol	9.7	302>95	56	302>70	16
Fluxapyrosad	11.2	382>362	10	382>342	15
Formetanate	1.4	222>165	8	222>65	52
Fosthiazate	9.4	284>228	10	284>104	20
Haloxyfop	12.0	362>316	12	362>288	24
Hexaconazole	12.7	314>159	30	314>70	20
Hexythiazox	13.9	353>228	10	353>168	20
Imazalil	9.4	297>255	15	297>159	20
Imidacloprid	4.8	256>209	15	256>175	15
Indoxacarb	13.0	528>218	20	528>203	45
Ioxonil	9.9	370>215	30	370>127	30
Iprovalicarb	11.7	321>203	0	321>119	16
Isocarbophos	10.0	290>121	28	290>65	60
Isofenfos-methyl	12.3	231>199	15	231>121	15
Isoprocarb	9.8	194>152	5	194>95	15
Isoxaflutole	10.1	360>251	15	360>220	50
Jasmolin I	14.5	331>163	10	331>107	20
Jasmolin II	13.1	375>121	20	375>163	5
Kresoxim-methyl	12.2	314>267	0	314>222	10
Linuron	10.7	249>160	20	249>133	36
Lufenuron	13.7	509>339	10	509>326	10
Malathion	11.3	331>127	10	331>99	20
Malathion-d10 (I.S)	11.2	341>132	12	341>100	24
Mandipropamid	11.0	412>356	4	412>328	8
MCPA	9.8	199>155	5	199>141	10
Mepanypirim	11.2	224>207	10	224>191	20
Meptyldinocap	14.4	295>193	42	295>163	50
Metaflumizone	13.6	505>302	10	505>328	10
Metalaxyl	10.0	280>220	5	280>192	10
Metconazole	12.6	320>125	48	320>70	24
Methamidophos	1.4	142>125	10	142>94	10
Methidathion	10.2	303>145	0	303>85	15
Methiocarb	10.8	226>121	12	226>169	5

Methiocarb-sulfone	6.1	275>122	15	275>201	5
Methiocarb-sulfoxide	5.4	242>185	10	242>170	20
Methomyl	3.0	163>106	4	163>88	0
Methoxyfenozone	11.5	370>149	15	370>133	20
Metobromuron	9.5	259>170	15	259>148	10
Monocrotophos	3.9	224>193	5	224>127	10
Myclobutanil	11.4	289>125	20	289>70	15
Nitencyram	2.5	271>225	10	271>99	10
Omethoate	1.8	214>183	5	214>125	20
Oxadixyl	7.7	279>219	5	279>132	32
Oxamyl	2.5	237>90	5	237>72	10
Oxyfluorfen	13.4	362>237	30	362>252	25
Paclobutrazol	11.2	294>125	36	294>70	16
Paraoxon-methyl	7.5	248>202	15	248>109	30
Penconazole	12.3	284>159	20	284>70	15
Pencycuron	12.8	329>125	24	329>89	60
Pendimethalin	13.7	282>212	4	282>194	16
Penflufen	12.3	318>234	10	318>141	20
Penthiopyrad	12.4	358>149	25	358>207	20
Phenthoate	12.2	321>247	4	321>79	44
Phosalone	12.7	368>182	8	368>111	44
Phosmet	10.3	318>160	8	318>133	36
Phoxim	12.5	299>129	4	299>	24
Pirimecarb	7.5	239>182	15	239>72	20
Pirimecarb-desmethyl	4.8	225>168	8	225>72	20
Pirimiphos-methyl	12.6	306>164	20	306>108	20
Prochloraz	12.4	376>308	10	376>266	15
Procymidone	11.6	301>284	28	284>255	28
Profenofos	13.3	375>347	5	375>305	15
Propamocarb	1.9	189>144	10	189>102	15
Propaquizafop	13.4	444>371	15	444>100	20
Propargite	14.0	368>23	0	368>175	8
Propiconazole	12.5	342>159	32	342>69	16
Propoxur	8.4	210>168	5	210>111	10
Propyzamide	11.2	256>190	10	256>173	20
Proquinazid	14.0	373>331	20	373>289	20
Prothioconazole	12.5	342>306	15	342>100	20
Prothiofos	14.5	345>241	20	345>161	40
Pymetrozine	1.4	218>105	20	218>51	60
Pyraclostrobin	12.4	388>194	8	388>163	20
Pyrethrin I	14.2	329>161	5	329>143	20
Pyrethrin II	13.1	373>161	10	373>133	15
Pyridaben	14.4	365>309	10	365>147	20
Pyridate	14.7	379>351	5	379>207	10

Pyrimethanil	9.9	200>183	20	200>107	20
Pyriproxyfen	13.5	322>185	20	322>96	10
Quinoclamine	7.6	208>105	25	208>77	40
Quinoxifen	13.6	308>272	25	308>197	35
Quizalofop-ethyl	13.1	373>271	24	373>255	36
Rotenone	11.8	395>213	20	395>192	20
Spinetoram	12.8	748>142	40	748>98	40
Spinosyn A	12.5	733>142	20	733>98	20
Spinosyn D	12.8	747>142	20	747>98	20
Spirodiclofen	14.3	411>313	5	411>71	15
Spiromesifen	14.1	371>273	5	371>255	20
Spirotetramat	11.6	374>330	15	374>270	20
Spiroxamine	10.9	298>144	20	298>100	20
Tebuconazole	12.3	308>125	20	308>70	20
Tebufenozide	12.3	353>297	5	353>133	15
Tebufenpyrad	13.4	334>145	20	334>117	47
Teflubenzuron	13.4	379>359	0	379>339	4
Terbuthylazine	10.9	230>174	15	230>146	20
Tetraconazole	11.8	372>159	36	372>70	20
TFNA	2.27	192>148	20	192>98	30
TFNG	2.8	249>202	15	249>176	20
Thiabendazol	4.2	202>175	30	202>131	40
Thiacloprid	6.5	253>186	10	253>126	20
Thiamethoxam	3.4	292>211	10	292>181	20
Thiobencarb	12.7	258>125	15	258>100	10
Thiodicarb	9.0	355>108	8	355>88	8
Tolclofos-methyl	12.5	301>269	10	301>125	15
Triadimenol	11.6	296>227	5	296>70	10
Triazophos	11.4	314>286	10	314>162	20
Trichlorfon	5.6	257>221	4	257>109	12
Trifloxystrobin	13.0	409>206	10	409>186	20
Triflumuron	12.6	359>156	8	359>139	32
Triticonazole	11.6	318>125	41	318>70	33
Zoxamide	12.4	336>187	16	336>159	44

Tabla AI.1 Plaguicidas, tiempo de retención e iones monitorizados mediante LC-MS/MS.

ANEXO II: MATRICES ANALIZADAS

Nº	Matriz	Tipo de matriz	Procedencia
1	Manzana	Royal Gala	Portugal
2	Manzana	Golden	Portugal
3	Pera	Roche	Portugal
4	Cayena	Cayena dulce	India
5	Pimienta verde	Pimienta verde	India
6	Anís	Anís de grano	Egipto
7	Pimienta de Jamaica	Pimienta de Jamaica	Guatemala
8	Té verde	Té verde (camelia sinensis)	Portugal
9	Pimiento verde	Pimiento verde morrón	Uruguay
10	Yerba mate	Yerba mate	Brasil
11	Lechuga	Mix Crespa blanca + Roble blanca + Roble morada	Uruguay
12	Frambuesas	Frambuesas	España(Huelva)
13	Fresón	Fresón	España(Huelva)
14	Pimiento Rojo	Pimiento Rojo	España(El Bellicar, Almería)
15	Berenjena	Cristal	España
16	Apio	Verde	España
17	Judía verde plana	Helda	España
18	Banana	Cavendish	Ecuador
19	Tomate redondo	Ramyle	España
20	Limón	Primofiori	España(Murcia)
21	Pera	Conference	España(La Rioja)
22	Espinaca	Brotos de espinaca	Portugal
23	Brócoli	Brócoli	España
24	Coliflor	Coliflor	España
25	Lechuga	Iceberg	España
26	Manzana	Rojo Delicioso	Italia
27	Kiwi verde	Hayward	Italia
28	Pepino	Frances	España
29	Calabacín	Victoria	España
30	Champiñón	Agaricus Bisporus	Portugal
31	Cebolla	Recas	España
32	Pomelo	Star Ruby	España
33	Ajo	Spring Violeta	España
34	Mandarina	Hermandina	España
35	Tomate cherry pera	Angelle	España
36	Jengibre	Amarillo	Perú

37	Aguacate	Hass	España
38	Piña	Piña	Costa Rica
39	Puerro	Puerro	España
40	Romero	Romero	España
41	Manzanilla	Manzanilla Mhon	España
42	Tomillo	Tomillo Limonero	España
43	Zanahoria	Nevada	España
44	Mango	Kent	Perú
45	Zanahoria	Nantesa	Holanda
46	Zanahorias	Mini zanahorias	Dinamarca
47	Manzana	Granny Smith	Italia
48	Kiwi	Haward	Italia
49	Calabacín	Brillante	España
50	Manzana	Gala	Italia
51	Tomate	Rama	España
52	Calabaza	Dolceta	España
53	Patata	Nueva Agria	España
54	Pera	Conferencia	Italia
55	Calabaza	Butterunt	España
56	Manzana	Gala	Italia
57	Limón	Primofiori	España
58	Kiwi	Hayward	Italia
59	Judía	Helda	España
60	Berenjena	Negra	España
61	Mango	Kent	Perú
62	Cebolla	Recas	España
63	Naranja	Lane Late	España
64	Piña	Piña	Costa Rica
65	Puerro	Puerro	España
66	Naranja	Navel lane late	España
67	Patata	Agria	España
68	Remolacha	Remolacha	España (Murcia)
69	Chirimoya	Fino de Jete	España (Málaga)
70	Alcachofa	Alcachofa	España (Cambrils)
71	Tomate	Rama	España (Almería)
72	Plátano	Plátano de canarias	España(Canarias)
73	Pepino	Pepino	España
74	Mandarina	Mandarina	España
75	Brócoli	Brócoli	España
76	Naranja	Naranja	España
77	Limones	Limones	España
78	Pimiento	Pimiento rojo	España
79	Calabacín	Calabacín	España
80	Brócoli	Brócoli	España
81	Champiñón	Agaricus bisporus	Portugal
82	Zanahoria	Zanahoria	Holanda

83	Pepino	Pepino	España
84	Ajo	Ajo	España
85	Tomate	cóctel	España
86	Tomate	cherry	España
87	Aguacate	Hass	España
88	Boniato	Beauregard	España
89	Hinojo		España (Murcia)
90	Cebolla	Consuay	Holanda
91	Coliflor	Casper	España (Valencia)
92	Ajo	Ajo Spring Violeta	España (Cuenca)
93	Apio		España (Murcia)
94	Plátano	Cavendish	España (Canarias)
95	Patata	Ditta	Francia
96	Pimiento	Palermo	España (Almería)
97	Manzana	Golden Delicious	Italia
98	Manzana	Fuji kiku	Italia
99	Aceite girasol	Girasol	España
100	Aceite soja	Soja	España
101	Aceite oliva	Oliva	España
102	Té rojo	Té rojo	No UE
103	Té verde	Té verde	No UE
104	Té negro	Té negro	No UE
105	Té blanco	Té blanco	No UE
106	Orégano		España
107	Perejil		España
108	Aceite de oliva	Aceite de oliva	España
109	Aceite de oliva	Aceite de oliva	España
110	Cúrcuma	Cúrcuma	España
111	Comino molido	Comino molido	España

Tabla A.II.1. Tipo y procedencia de las matrices analizadas.

ANEXO III: RESULTADOS

1 Manzana		2 Manzana		12 Frambuesa	
Pesticida	mg/kg	Pesticida	mg/kg	No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	
Boscalid	0.007	Boscalid	0.008		
Fludioxinil	0.043	Fludioxinil	0.050		
Pyrimethanil	0.008	Pyrimethanil	0.008		
3 Pera		4 Cayena		6 Anís	
No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		Pesticida	mg/kg	No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	
		Chlorpyrifos	0.101		
		Phosalone	0.032		
		Tebuconazole	0.025		
7 Pimienta de Jamaica		9 Pimiento verde		16 Apio	
No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	
17 Judía verde plana		21 Pera		22 Espinacas	
No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		Pesticida	mg/kg	Pesticida	mg/kg
		Spinetoram	0.137	Spinetoram	0.008
		Spinosin A	0.105	Spinosin D	0.009
		Spinosin D	0.112		
33 Ajo		38 Piña		39 Puerro	
Pesticida	mg/kg	Pesticida	mg/kg	No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	
Azoxystrobin	0.035	Fludioxinil	0.007		
42 Tomillo		54 Pera		57 Limón	
Pesticida	mg/kg	Pesticida	mg/kg	No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	
Imidacloprid	0.066	Spinosin A	0.006		
MCPA	0.060	Spinosin D	0.007		
59 Judía verde		61 Mango		63 Remolacha	
No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	
64 Piña		65 Puerro		70 Alcachofa	
No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	

72 Plátano		78 Pimiento		84 Ajo	
Pesticida	mg/kg	No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ	
Spinetoram	0.025				
Spinosin A	0.019				
Spinosin D	0.024				
85 Tomate		88 Boniato		92 Ajo	
No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		Pesticida	mg/kg	Pesticida	mg/kg
		Chlorpyrifos	0.007	Azoxystrobin	0.016
101 Aceite de oliva		102 Té rojo		106 Orégano	
Pesticida	mg/kg	No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ		Pesticida	mg/kg
Phosmet	0.015			Fluazifop	0.030
107 Perejil		109 Aceite de oliva			
Pesticida	mg/kg	No se detectaron residuos a niveles superiores al LOQ			
Mandipropamid	0.028				
Prothioconazole-desthio	0.030				
Quinoxifen	0.031				

Tabla A.III.1. Resultados positivos obtenidos.

