



**MÁSTER UNIVERSITARIO OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y
AGROALIMENTARIA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

“Determinación de plaguicidas en nutraceúticos procedentes de hojas de té”

AUTOR: Antonio José Nieto García

TUTORES: Roberto Romero González / Francisco García Camacho

Julio 2013

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

“Determinación de plaguicidas en nutraceúticos procedentes de hojas de té”

Los directores del presente trabajo fin de máster realizado por el alumno **ANTONIO JOSÉ NIETO GARCÍA**, autorizan su presentación y defensa ante el Tribunal para obtener el título de Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria, en el itinerario de Bioagronomía y Biotecnología de alimentos (opción investigadora).

Fdo. Antonio José Nieto García

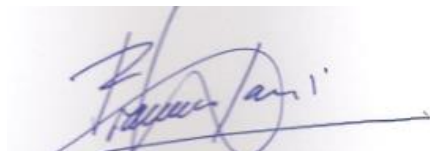
Handwritten signature in blue ink that reads "ANTONIO NIETO GARCIA".

TUTORES: Roberto Romero González y Francisco García Camacho

Fdo. Roberto Romero González

Handwritten signature in blue ink, appearing as a stylized 'R'.

Fdo. Francisco García Camacho

Handwritten signature in blue ink that reads "Francisco Camacho".

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Seguridad Alimentaria	2
2.2. Nutraceuticos	3
2.3. Té verde y polifenoles	4
2.4. El té y los plaguicidas	6
2.5. Metodología analítica para la determinación de residuos de plaguicidas en nutraceuticos	7
2.5.1. <i>Extracción QuEChERS</i>	7
2.5.2. <i>Cromatografía de líquidos (LC)</i>	8
2.5.3. <i>Espectrometría de masas (MS)</i>	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Reactivos y productos químicos	13
3.2. Procedimiento de extracción utilizado	14
3.3. Instrumentación	14
3.4. Análisis cromatográfico.....	14
3.5. Muestras de té verde	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Optimización del método cromatográfico	16
4.2. Optimización del procedimiento de extracción	19
4.2.1. <i>Comparación QuEChERS americano y europeo</i>	19
4.2.2. <i>Evaluación de la etapa de limpieza</i>	21
4.3. Validación del método analítico	24
4.4. Análisis de muestras reales.....	33
5. CONCLUSIONES	36
6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	37
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. RESUMEN

El término nutraceútico hace referencia a aquellos alimentos y sustancias bioactivas que están presentes en ellos y que aportan un efecto beneficioso sobre la salud humana, siendo consumidos en un formato de matriz no alimenticia con concentraciones más elevadas a las presentes de forma natural en el propio alimento. Teniendo en cuenta que durante el cultivo de té verde se emplean plaguicidas, es de suponer que éstos puedan llegar al producto final, es decir, a los comprimidos nutraceúticos, que son elaborados a partir de las hojas de té. En este trabajo se pretende utilizar un método analítico basado en la cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) para la determinación de residuos de plaguicidas en este tipo de productos. Se evaluará un método de extracción basado en la metodología QuEChERS. El método será optimizado y validado para su aplicación en la determinación de la presencia de este tipo de contaminantes en comprimidos nutraceúticos elaborados a partir de hojas de té verde.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Seguridad Alimentaria

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agriculture Organization*, FAO) [1] define la seguridad alimentaria de la siguiente forma: *“La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas tienen acceso en todo momento (ya sea físico, social y económico) a alimentos suficientes, seguros y nutritivos para cubrir sus necesidades nutricionales y las preferencias culturales para una vida sana y activa”*. Dentro de este marco, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) define el límite máximo de residuos (*maximum residue limit*, MRL) como *“la concentración máxima de residuos (expresada en mg/kg) de plaguicidas permitida legalmente para su uso en alimentos o piensos basándose en buenas prácticas agrícolas y tratando de garantizar la exposición más baja posible a los consumidores”* [2].

Para que un alimento sea de calidad no sólo hay que considerar su valor nutritivo o sus cualidades organolépticas, sino también su seguridad, vinculada siempre a la ausencia de agentes químicos o biológicos capaces de atentar contra la salud del consumidor. Los peligros químicos son una fuente importante de enfermedades

transmitidas por los alimentos, aunque muchas veces es difícil asociar los efectos con un alimento determinado e incluso pueden producirse mucho tiempo después del consumo del producto. En este sentido la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO) define la contaminación alimentaria como “*la presencia de cualquier materia anormal en el alimento que comprometa su calidad para el consumo humano*” [3]. Por tanto, es imprescindible certificar que los alimentos disponibles en el mercado a disposición de los consumidores están libres de productos tóxicos o de residuos de éstos y si se encuentran presentes, que éstos no superan los valores máximos fijados por la legislación [4].

2.2. Nutraceuticos

Se conocen como productos nutraceuticos a los suplementos dietéticos que contienen una forma concentrada de un presunto agente bioactivo procedente de un alimento presentados en una matriz no alimentaria y que se utilizan con el propósito de mejorar la salud en dosis que exceden aquellas que se podrían obtener al consumir los alimentos normalmente [5].

Cabe destacar la diferencia entre nutraceuticos y los llamados alimentos funcionales, que son aquellos que cuando se consumen regularmente producen un efecto beneficioso específico para la salud más allá de sus propiedades nutricionales [6,7]. El límite entre nutraceuticos y alimentos funcionales no siempre está claro pero una diferencia principal es el formato en el que se consumen. Así, mientras que los nutraceuticos se consumen como cápsulas, píldoras, comprimidos, etc., los alimentos funcionales siempre se consumen como alimentos ordinarios.

La capacidad de algunos de los alimentos derivados de las plantas para reducir el riesgo de enfermedades crónicas se asocia a la participación de metabolitos secundarios que ejercen una amplia gama de actividades biológicas. En general, estos metabolitos tienen baja potencia como compuestos bioactivos, si se comparan con medicamentos farmacéuticos, pero ingiriéndolos con regularidad y en cantidades significativas como parte de la dieta, pueden tener un notable efecto fisiológico a largo plazo.

Por lo general, son productos seguros y bien tolerados, pero la interpretación de unos resultados a nivel global se ve obstaculizada por la heterogeneidad de los estudios, los resultados inconsistentes, y/o investigaciones no muy bien diseñadas [5]. Por otro

lado, se espera que los nutraceúticos sean sustancialmente más seguros y con menos efectos secundarios que muchos fármacos habitualmente prescritos en el tratamiento de ciertos síntomas. Sin embargo, a menudo son costosos y no existe una fabricación normalizada por parte de las compañías productoras, y a veces no logran el efecto deseado sobre el organismo.

En este ámbito, no existe una reglamentación específica en Europa para controlar estos productos nutracéuticos, aunque se consideran en el mismo marco de leyes que regulan las medicinas. En cambio, en los Estados Unidos, la Agencia de alimentos y medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) se encarga de regular los suplementos dietéticos en base a un conjunto de normas relacionadas con alimentos convencionales y medicamentos [8].

2.3. Té verde y polifenoles

Los efectos beneficiosos para la salud del té verde derivan de sus múltiples componentes activos, entre ellos los polifenoles, cuyos principales tipos se muestran en la Figura 1. Éstos son un grupo de sustancias químicas presentes en las plantas que se caracterizan por poseer más de un grupo fenol por molécula. El tipo de polifenoles más abundante en el té son los flavonoides, que son pigmentos vegetales no nitrogenados y tienen un papel muy importante en la alimentación humana por sus propiedades medicinales [9], mostrándose a continuación las más destacadas [10,11]: (i) propiedades antioxidantes (especialmente catequinas en té verde); (ii) propiedades anticancerosas; (iii) propiedades cardiotónicas; (iv) disminución de la fragilidad de capilares sanguíneos; (v) propiedades antitrombóticas; (vi) disminución del colesterol; (vii) protección del hígado; (viii) protección estomacal y antiulcerosos; (ix) antiinflamatorias y analgésicas; (x) antimicrobianas.

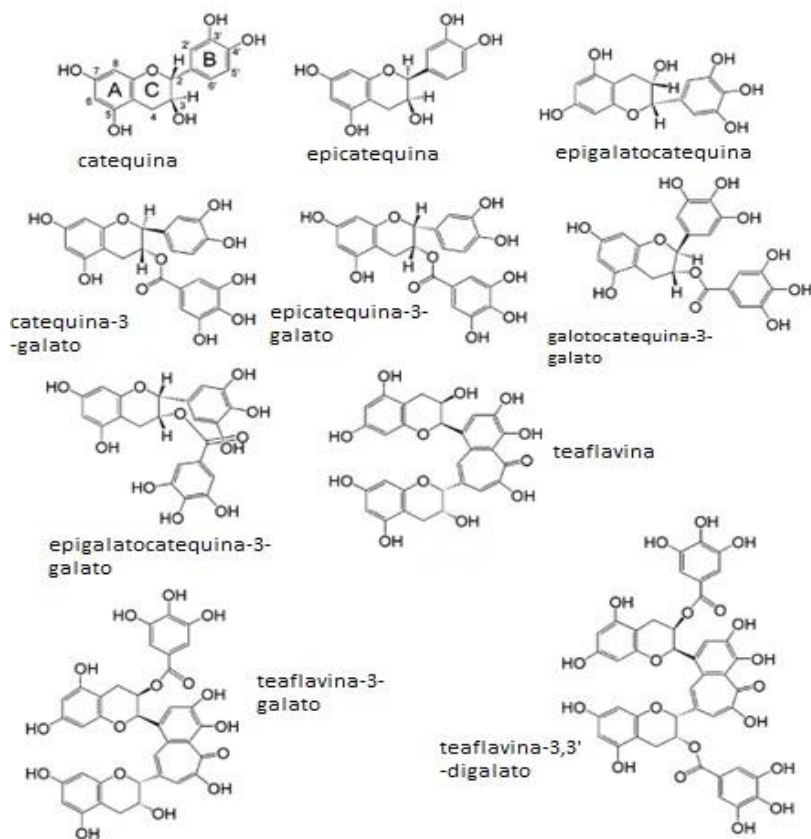


Figura 1. Principales polifenoles presentes en el té.

Los principales flavonoides presentes en el té son las catequinas, dentro de las cuales existen cuatro grupos principales: Epicatequina (EC), epicatequina galata (ECG), epigalocatequina (EGC) y epigalocatequina galata (EGCG). Ésta última por si sola concentra un 32% de toda la actividad antioxidante del té verde, siendo de 40 a 100 veces más efectiva que la vitamina C y 25 veces más potente que la vitamina E [12].

La acción antioxidante del té verde es la base de casi todos sus beneficios, destacando [9]:

- Previene enfermedades cardiovasculares evitando la oxidación del colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*, conocido vulgarmente como “colesterol malo”), impidiendo trombos en vasos sanguíneos y disminuyendo las probabilidades de accidentes cardiovasculares.
- Reduce los riesgos de cáncer impidiendo que los radicales libres dañen y causen mutaciones a las células.
- Retrasa el envejecimiento de la piel y órganos internos.

- Propiedades antiinflamatorias mejorando dolencias como la artritis.

Existen además otros compuestos activos importantes en la composición del té verde, como son las metilxantinas [9] (alcaloides estimulantes del sistema nervioso central) y los taninos (poseen propiedades astringentes, es decir, producen constricción y sequedad de los tejidos orgánicos, disminuyendo así la secreción).

Por último, cabría destacar ciertos estudios epidemiológicos que muestran una relación inversa entre el consumo de té y el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson. Así, diversos ensayos muestran el efecto neuroprotector del té verde (fundamentalmente debido a EGCG) frente al Parkinson inducido por la toxina medioambiental MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3,6-tetrahydropyridine) en modelos de ratón [13].

2.4. El té y los plaguicidas

La aplicación de plaguicidas durante el cultivo y almacenamiento del té representa una práctica común para la lucha contra plagas y enfermedades de las plantas. Ya que los comprimidos de té verde están elaborados a partir de extractos concentrados de las hojas de la planta, deben ser sometidos a rigurosos controles para asegurar el cumplimiento de MRLs de residuos de plaguicidas que puedan suponer un riesgo para la salud del consumidor por exposición aguda o prolongada. Además, el nivel de residuos de plaguicidas en el té puede ser mayor que en otros cultivos básicos por dos razones: las hojas tienen una gran área superficial por unidad de masa y en segundo lugar, durante el proceso de secado, la masa de hojas se reduce, resultando en un incremento en la concentración de plaguicida en el producto final.

La matriz de té es bastante compleja ya que las hojas de té contienen azúcares, pigmentos (por ejemplo, clorofila), polifenoles y alcaloides, especialmente cafeína, que es difícil de eliminar de la muestra debido a su similitud en relación a las propiedades química con los plaguicidas y su elevada concentración [14].

Estudios previos [15] ya han informado de la detección de residuos de plaguicidas en té verde detectándose plaguicidas en 18 muestras de té verde analizadas, observando que el acetamiprid es el compuesto más frecuentemente detectado (> 60%), mientras que otros compuestos también encontrados fueron imidacloprid y carbendazim (> 50

%), triazofos (> 40 %), dimetoato, metomilo y uprofezin (> 30 %) y triadimenol (> 20 %), aunque los valores encontrados eran siempre inferiores a los MRLs establecidos por la legislación china y europea, excepto para el dimetoato y metomilo en 5 muestras. Por tanto, cabría esperar su posible presencia también en este tipo de nutraceúticos obtenidos a partir de la concentración de hojas de té verde, aunque hasta la fecha no se ha realizado un estudio de la presencia de residuos de plaguicidas en dichos productos nutraceúticos.

2.5. Metodología analítica para la determinación de residuos de plaguicidas en nutraceúticos.

2.5.1. Extracción QuEChERS

En los últimos años, la metodología QuEChERS (acrónimo en inglés de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro) se ha usado como procedimiento de extracción de residuos de plaguicidas de una gran variedad de matrices [16]. Para la extracción se toma una muestra representativa y homogénea y se adiciona acetonitrilo, seguido de la adición de sales como cloruro sódico y sulfato magnésico. Esto induce la separación de las dos fases y el analito migra de la fase acuosa a la fase orgánica consiguiéndose recuperaciones aceptables [17]. Además de las sales se pueden añadir agentes reguladores de pH como citrato y patrones internos para minimizar los posibles errores que se puedan cometer durante el proceso de extracción [18].

Existen diversas variantes del método QuEChERS:

- Método Original, desarrollado por *Anastassiades et al.* en 2003 [19]. Se emplea cloruro sódico para mejorar la separación entre fases.
- Método Oficial AOAC 2007.01 [20]. Se usa acetato de sodio como tampón en sustitución del NaCl y 1% de ácido acético en la disolución orgánica del acetonitrilo.
- Variante de Doble Fase. Se emplea amina primaria-secundaria (*primary-secondary amine*, PSA) y carbón negro grafitizado (*graphitized carbon black*, GCB) [21] para eliminar altos niveles de clorofila y esteroides en el extracto final

sin pérdida de los plaguicidas planares (polares aromáticos) usando una mezcla de acetona:tolueno (3:1).

- Método Oficial Europeo EN15662 [18]. Similar al método AOAC, pero emplea citrato de sodio dihidrato y citrato de sodio sesquihidrato en lugar de acetato de sodio.

De forma general, el QuEChERS incluye una etapa de limpieza en fase sólida dispersiva (dSPE) y es el más ampliamente extendido para la extracción de residuos de plaguicidas en frutas y verduras. También es uno de los más empleados para el análisis de plaguicidas en té [15,16] seguido de otros como la extracción con líquidos presurizados (*pressurized liquid extraction*, PLE) [22], la extracción sólido-líquido (*solid liquid extraction*, SLE), extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE) [23], la dispersión de matriz en fase sólida (*matrix solid phase dispersión*, MSPD) [24] o la microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*, SPME) [25].

2.5.2. Cromatografía de líquidos

A finales de 1990, los plaguicidas en el té se determinaban principalmente mediante cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) equipados con detectores nitrógeno-fósforo (o llama alcalina) o detectores de captura de electrones. Estos detectores requieren un paso elaborado de preparación de la muestra y no eran adecuados para muchos plaguicidas [14]. Hoy en día, las técnicas cromatográficas, junto con detectores de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), son las técnicas más empleadas para la determinación de plaguicidas en té [15].

Inicialmente, la cromatografía de líquidos (*liquid chromatography*, LC) se empleaba para analizar todo aquello que no se podía analizar por GC, es decir, compuestos no volátiles, termolábiles o polares. Actualmente LC se encuentra en un periodo de máxima expansión y su rango de análisis no se centra solo en los compuestos incompatibles con GC sino que muchas aplicaciones se solapan [26].

El análisis mediante LC consta de tres etapas:

- 1- Inyección de la muestra
- 2- Separación en la columna cromatográfica
- 3- Detección mediante el empleo de un detector (espectrómetro de masas en este caso)

El desarrollo y la optimización de un método cromatográfico requiere del estudio de la composición y flujo de fase móvil, el tipo de columna y el gradiente de fase móvil. En el 95% de las ocasiones se emplea un disolvente polar como fase móvil y una fase estacionaria o columna apolar (fase reversa), tipo C₁₈.

Para aumentar la eficacia de la separación y así incrementar la resolución de la técnica es necesario emplear fases estacionarias con tamaño de partícula entre 2-5 µm. Esto implica la necesidad de impulsar la fase móvil con un sistema de alta presión, dando lugar a la cromatografía de líquidos de alta presión (*high pressure liquid chromatography*, HPLC).

El empleo de fases estacionarias con un tamaño de partícula inferior a 2 µm supuso la utilización de nuevas bombas que permitan trabajar con presiones superiores a 10000 psi, apareciendo lo que se denomina cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (*ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC). Para hacer efectivo el potencial en velocidad de análisis, resolución y sensibilidad y trabajar a elevadas presiones se desarrollaron nuevas fases estacionarias de partícula híbrida que tienen un componente inorgánico (sílice) y un componente orgánico (organosiloxanos). Las columnas más empleadas son las rellenas de octadecilsilano (C₁₈) debido a la gran eficiencia que ofrecen en métodos multi-residuo y poseen diámetros de partícula < 2 µm, siendo válidas para un gran número de aplicaciones y analitos. Además se rebaja considerablemente el tiempo de análisis, siendo a veces inferior a 10 minutos.

2.5.3. Espectrometría de masas (MS)

El uso de técnicas cromatográficas acopladas a sistemas de detección de espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) en el análisis de contaminantes a niveles traza es una metodología ampliamente extendida, proporcionando información cualitativa y cuantitativa de gran calidad. MS es una técnica muy potente para la

cuantificación y confirmación de contaminantes dada la alta sensibilidad y selectividad que ofrece.

Es una técnica instrumental que a través de la generación de iones en fase gaseosa, proporciona información de la masa molecular del compuesto analizado así como información estructural del mismo tres etapas:

- Ionización de la muestra.
- Separación y análisis de los iones y fragmentos cargados según su relación masa/carga (m/z).
- Medición, amplificación y registro de la corriente iónica generada en el detector. El espectro de masas resultante es una representación de la abundancia relativa de los iones generados frente a la relación m/z .

En LC, el modo de ionización más empleado es la ionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure ionization*, API), pudiendo distinguir la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) y la electronebulización (*electrospray ionization*, ESI), siendo ésta última la más utilizada para compuestos de baja masa molecular e ionizables en disolución. En la Figura 2 se muestra un esquema del proceso de ionización llevado a cabo en ESI. Básicamente, la muestra se disuelve en una fase móvil volátil y se bombea a través de un fino capilar de acero inoxidable cuyo extremo se encuentra a un potencial eléctrico elevado [27]. Este gran potencial unido al pequeño radio de curvatura al final del capilar crea un fuerte campo eléctrico, que produce reacciones de oxidación-reducción y hace que el líquido emerja como finas gotas finas cargadas eléctricamente [28]. En la formación de las gotas cargadas resultan críticas la velocidad del flujo, la tensión superficial y la conductividad de la solución. La nebulización ocurre a presión atmosférica y es usualmente asistida por un flujo de nitrógeno gaseoso que fluye a través de un tubo coaxial al capilar principal. La “nube” generada atraviesa una serie de cámaras con vacío creciente y las gotas van evaporándose y haciéndose cada vez más pequeñas por la evaporación del disolvente. Al mismo tiempo dado que el área superficial de las gotas se reduce, aumenta la densidad de carga eléctrica sobre la superficie hasta llegar a un límite en que se tornan inestables y estallan.

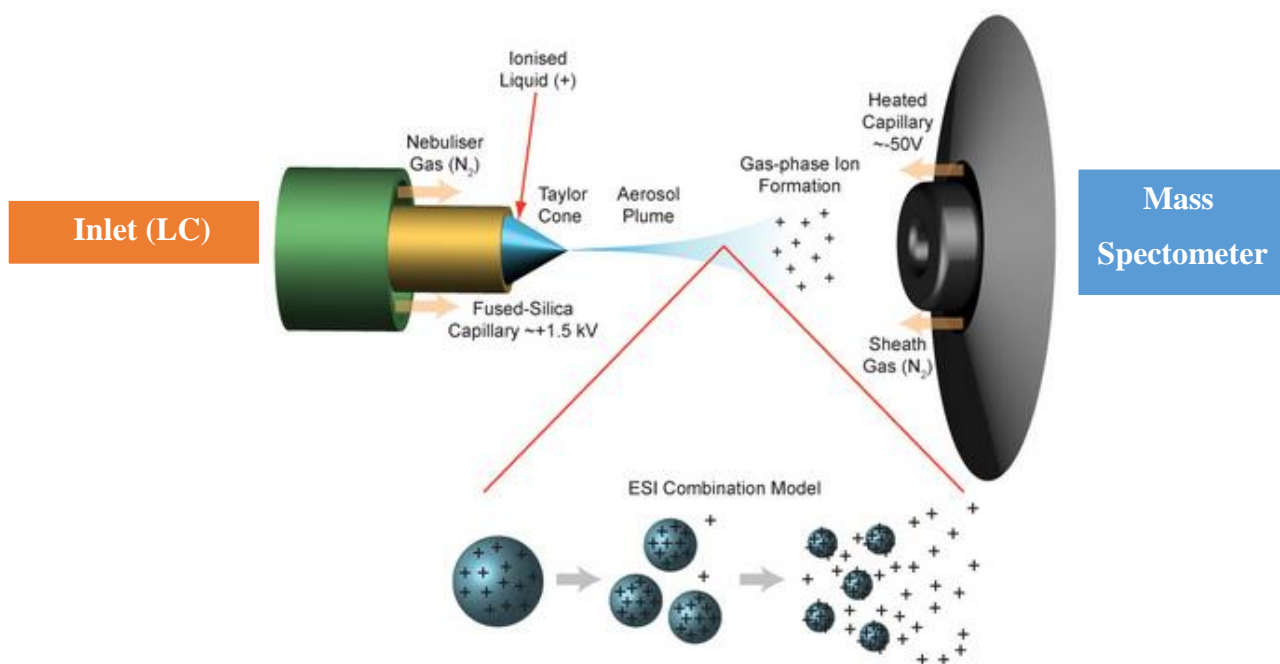


Figura 2. Ionización por electrospray (ESI).

(<http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php>).

El avance de MS y LC acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ha permitido el desarrollo de métodos multi-residuo para plaguicidas pertenecientes a diversas familias y en distintas matrices, lo que permite una detección cuantitativa eficiente sin necesidad de derivatización.

Entre los analizadores de masas empleados en la determinación de plaguicidas destaca el triple cuadrupolo (QqQ). En este analizador, el Q1 y Q3 actúan como separadores de masas y q2 actúa como celda de colisión. Este analizador suele trabajar en modalidad tándem (MS/MS), implicando una etapa de separación y selección en Q1, una fragmentación en q2 y una última separación y selección en Q3. Cuando se emplea QqQ como analizador se pueden distinguir varios modos de trabajo:

- Barrido de iones producto
- Barrido de iones precursores
- Barrido de pérdida de neutros

- Monitorización de reacciones seleccionadas (*selected reaction monitoring, SRM*). Éste último se emplea el 99 % de las veces debido a su alta sensibilidad y selectividad y es el que más se usa con fines cuantitativos y para el análisis de trazas (Figura 3). Trabajando en este modo el primer cuadrupolo se configura para dejar pasar los iones precursores seleccionados aproximadamente en el tiempo de retención previsto para cada componente. A continuación, estos iones precursores pasan a una celda de colisión (q), a través de la cual se hace circular un gas de colisión (normalmente nitrógeno o argón) que chocará con los iones. Si durante la colisión se les proporciona una energía suficiente se van a producir fragmentos característicos de cada ion que pasarán al tercer filtro de masas (Q3). En este filtro de masas se seleccionará solo un fragmento específico del ion precursor [29]. Por lo tanto un compuesto determinado solo se detectará si el ion seleccionado en Q1 produce un determinado fragmento que posteriormente sea monitorizado en Q3.

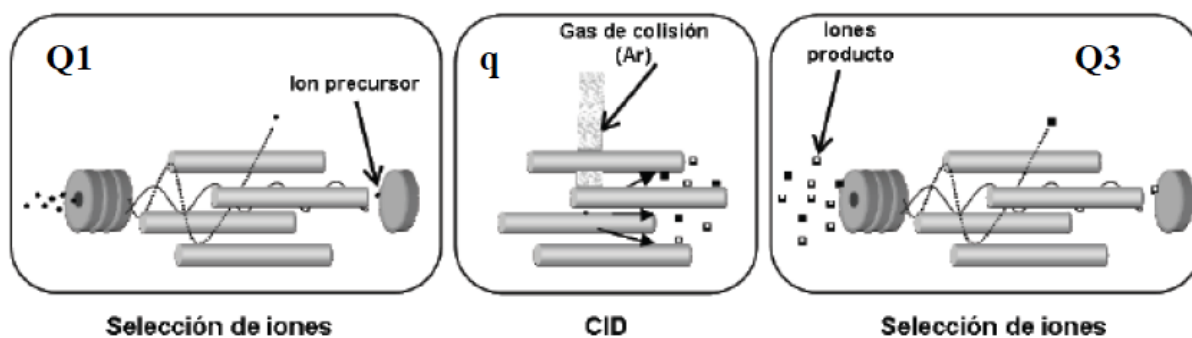


Figura 3. Esquema de funcionamiento de un analizador de masas de triple cuadrupolo.

Por lo tanto en el presente trabajo se trata el caso de los comprimidos de té verde elaborados a partir de un extracto concentrado de hojas de té y cuyos principales aportes a la salud son el efecto antioxidante y adelgazante que ofrece. Durante el proceso de elaboración de estos productos, el propósito es obtener la mayor concentración de sustancias bioactivas por comprimido, pero esto podría suponer también un aumento en la concentración de residuos de plaguicidas en el producto final. Por lo tanto, es importante evaluar la seguridad de estos productos nutraceúticos ya que actualmente no existe legislación para residuos de plaguicidas en este tipo de productos.

En este trabajo se pretende utilizar un método analítico basado en UHPLC-MS/MS para la determinación de residuos de plaguicidas en productos nutraceúticos procedentes de té. Para ello:

1. Se aplicará un método de UHPLC-MS/MS para la determinación de plaguicidas.
2. Se evaluará un método de extracción basado en la metodología QuEChERS.
3. Se llevará a cabo la validación del método analítico.
4. El método optimizado y validado se aplicará a distintos productos nutraceúticos para determinar la presencia de este tipo de contaminantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y productos químicos

Los patrones analíticos de los plaguicidas fueron proporcionados por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania), con una pureza superior al 99 %. Se prepararon disoluciones individuales de los analitos (con concentraciones en el rango entre 150-400 mg/L) mediante pesada exacta del sólido o el líquido y posterior disolución en acetona o metanol. A partir de estas disoluciones se preparó una disolución de trabajo en metanol conteniendo 1,5 mg/L de cada plaguicida, la cual se guardó bajo refrigeración a $T \leq 4$ °C.

El acetonitrilo, metanol, ácido acético glacial, cloruro sódico, hidrogenocitrato de sodio, acetona e isopropanol fueron obtenidos de J.T. Baker (Deventer, Holanda); PSA y GCB fueron obtenidos de Scharlab (Barcelona, España); ácido fórmico, sulfato de magnesio, acetato sódico y citrato sódico se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Todos los disolventes empleados eran de calidad HPLC. El agua ultrapura utilizada en la preparación de todas las disoluciones acuosas empleadas y de la fase móvil, se obtuvo de un sistema de gradiente de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.2. Procedimiento de extracción utilizado

Tras diversos ensayos experimentales se optó por el método de extracción QuEChERS americano sin etapa de limpieza. Este procedimiento consta de los siguientes pasos: (1) Colocar 2 g de muestra homogenizada en un tubo de centrífuga de 50 mL; (2) Adicionar 8 mL de agua destilada, agitar durante 30 seg y dejar reposar 15 min para la hidratación de la muestra; (3) Adicionar 10 mL de una solución de acetonitrilo y ácido acético al 1% y agitar vigorosamente durante 1 min; (4) Adicionar 4 g de sulfato de magnesio + 1 g de acetato sódico y agitar vigorosamente durante 1 min; (5) Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min y tomar 1 mL del extracto para su análisis cromatográfico.

3.3. Instrumentación

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un sistema de cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (UHPLC) Agilent (Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con una bomba binaria, un muestreador automático de alto rendimiento y un inyector automático termostatado. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo (A) y una disolución acuosa de ácido fórmico 0,01% (v/v) (B) a un caudal constante de 0,35 mL/min. La columna usada para la separación era una columna Hypersil Gold aQ (100 x 2,1 mm, tamaño de partícula 1,9 μ m) de Thermo Scientific (San José, CA, EE.UU.). La detección de los compuestos se realizó empleando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460 en el modo de ionización ESI+.

3.4. Análisis cromatográfico

Se inyectaron alícuotas de 5 μ L del extracto final. Para la separación cromatográfica de los plaguicidas se empleó el gradiente de elución mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de elución empleado.

% B	Tiempo (minutos)
90%	0,0
50%	2,5
10%	7,0
90%	9,5
90%	11,0

El tiempo de ejecución total es de 11 minutos por muestra, empleando una temperatura de la columna de 30 °C.

El espectrómetro de masas QqQ operaba en modo SRM bajo las siguientes condiciones: (i) un caudal constante de nitrógeno 9 L/min; (ii) temperatura de desolvatación de 325 °C; (iii) presión del nebulizador de 40 psi; (iv) voltaje del capilar de 3.000 V (en modo positivo).

La adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el software *Agilent Mass Hunter Workstation Data Acquisition* y *Quantitative Analysis for QQQ* respectivamente. El método analítico empleado incluía 128 plaguicidas, aunque algunos de ellos fueron eliminados después del proceso de optimización, ya que no cumplían con los requisitos adecuados.

3.5. Muestras de té verde

Los comprimidos y capsulas de té verde (*Camellia sinensis*) se obtuvieron en una tienda local y fueron utilizados para los blancos, muestras fortificadas y curva en matriz. Se analizaron diez muestras que previamente fueron trituradas para su homogenización y almacenadas a 4° C hasta su tratamiento. El procedimiento de extracción se llevó a cabo según la metodología descrita en el apartado 3.2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del método UHPLC-MS/MS.

En primer lugar se optimizaron las condiciones MS/MS, y para cada plaguicida se seleccionó el ion más abundante como ion precursor, fijándose para cada uno de ellos el mínimo voltaje que proporcionaba una señal constante y de mayor intensidad (Tabla 2). A continuación, trabajando en modo MS/MS, se sometieron a estudio las energías de colisión, a fin de obtener los iones producto. Como criterios de selección, se procedió a escoger aquellos iones producto con mayor m/z (más selectividad) y mayor intensidad (mayor sensibilidad). Así, para cada ion precursor se seleccionaron dos iones producto, empleándose el más sensible con fines de cuantificación y el segundo de mayor abundancia, para confirmación (Tabla 2).

A continuación se evaluó la composición de la fase móvil, y se estudió la influencia del disolvente orgánico en la separación de los plaguicidas objeto de estudio. En este sentido, se compararon las señales cromatográficas obtenidas cuando se empleó acetonitrilo o metanol como disolvente orgánico, obteniendo resultados similares. Teniendo en cuenta que como método de extracción se emplearía el QuEChERS, que implicaba un extracto en acetonitrilo, se decidió utilizar este disolvente como uno de los constituyentes de la fase móvil, con objeto de obtener una forma de pico más reproducible. En la Tabla 2 se muestra también la ventana de tiempo de retención para cada uno de los plaguicidas incluidos en este estudio.

Tabla 2. Parámetros de UHPLC-MS/MS para los plaguicidas analizados.

Compuesto	VTR (min) ^a	Ion precursor (Voltaje fragmentación de cono) ^b	Iones producto (energía de colisión, eV) ^c	Relación de iones (%)
8-Quinolinol	2.29-2.31	146 (130)	128 (24)^d ; 118 (20)	90
Acetamiprid	2.44-2.51	223 (90)	126 (16) ; 56 (12)	49
Aldicarb	2.51-2.59	213 (90)	156 (4); 75 (8)	15
Aldicarb sulfona	1.48-1.64	223 (50)	148 (2); 86 (8)	67
Aldicarb sulfóxido	1.26-1.42	207 (50)	132 (1) ; 89 (4)	28
Azaconazol	3.64-3.68	300 (90)	123 (1); 89 (80)	36

Bendiocarb	3.09-3.15	224 (50)	167 (1) ; 109 (12)	73
Benzoato de emamectina 1b	5.96-6.16	873 (210)	158 (36) ; 82 (80)	41
Bioaletrina	3.64-3.68	303 (90)	162 (32) ; 161 (28)	93
Bitertanol	4.46-4.52	338 (50)	99 (8); 70 (4)	80
Bromuconazol	4.14-4.21	376 (90)	159 (24) ; 70 (20)	33
Butocarboxim	2.51-2.59	213 (90)	116 (4); 75 (12)	19
Butocarboxim sulfóxido	1.27-1.41	229 (90)	166 (4) ; 92 (8)	11
Carbaril	3.33-3.35	202 (50)	145 (4) ; 127 (24)	32
Carbendazima	1.71-1.85	192 (90)	160 (16) ; 132 (32)	16
Carbofurano	3.10-3.16	222 (90)	165 (4) ; 123 (20)	64
Carbofurano 3-hidroxi	2.08-2.24	238 (70)	181 (5); 163 (10)	93
Clorantranipol	3.30-3.46	484 (90)	453 (12); 286 (4)	68
Cloridazona	1.70-1.92	222 (130)	77 (36); 65 (40)	84
Clofentizin	5.05-5.14	303 (90)	138 (8) ; 102 (36)	63
Cumafos	4.94-5.03	363 (130)	307 (12); 227 (20)	59
Ciromazina	0.87-0.89	167 (130)	85 (16) ; 68 (40)	95
Demeton-S-metil	2.98-3.05	253 (80)	89 (10) ; 61 (35)	40
Desmetrina	2.97-3.12	214 (90)	172 (12) ; 82 (32)	48
Diclobutrazol	4.30-4.35	328 (90)	159 (40); 70 (20)	6
Dicrotofos	1.86-1.95	238 (50)	112 (4) ; 72 (20)	54
Diflubenzuron	4.34-4.40	311 (90)	158 (8) ; 141 (36)	66
Difenilamina	4.41-4.46	170 (120)	93 (30) ; 65 (30)	26
Disulfoton sulfona	3.71-3.76	307 (90)	153 (4); 97 (28)	56
Disulfoton sulfóxido	3.38-3.43	291 (50)	213 (4); 185 (8)	81
Diuron	3.56-3.60	233 (120)	160 (20); 72 (20)	11
Epoxiconazol	4.25-4.30	330 (150)	141 (10); 121 (15)	12
Espiroxamina	4.51-4.86	298 (90)	144 (16) ; 100 (32)	36
Etiofencarb sulfona	2.00-2.13	258 (50)	201 (2); 107 (8)	88
Etiofencarb sulfóxido	1.94-2.05	242 (50)	185 (1) ; 107 (12)	76
Etoxiquina	3.68-4.00	218 (130)	174 (28); 160 (36)	91
Etofenprox	6.78-6.81	394 (90)	359 (4); 177 (8)	48
Etoxazol	5.95-6.00	360 (130)	141 (28) ; 113 (64)	27
Fenazaquin	6.49-6.52	307 (90)	161 (12); 57 (24)	59
Fenbuconazol	4.45-4.50	337 (130)	125 (28); 70 (16)	69
Fenhexamida	4.10-4.15	302 (90)	97 (20) ; 55 (44)	90

Fenmedifam	3.84-3.89	301 (50)	168 (1); 136 (12)	86
Fenpropidin	4.58-4.68	274 (130)	147 (28) ; 117 (60)	26
Fenpropimorf	4.44-4.82	304 (130)	147 (28) ; 117 (64)	30
Fenproxiimat	5.98-6.03	422 (130)	366 (8) ; 138 (28)	13
Fensulfotión	3.62-3.67	309 (90)	173 (20) ; 140 (40)	42
Flubendiamida	4.59-4.67	705 (205)	531 (45) ; 174 (35)	98
Flufenoxuron	5.84-5.89	489 (90)	158 (16) ; 141 (52)	57
Fluquinconazol	4.18-4.23	376 (90)	349 (25); 307 (20)	67
Flusilazol	4.44-4.48	316 (130)	247 (12) ; 165 (24)	90
Flutolanil	4.31-4.37	324 (90)	262 (12) ; 242 (20)	78
Flutriafol	3.39-3.43	302 (90)	123 (24); 70 (12)	31
Forclorfenuron	3.43-3.47	248 (90)	129 (12) ; 93 (36)	39
Formetanato	3.10-3.16	222 (90)	165 (8) ; 65 (52)	2
Fosfamidon	2.75-2.82	300 (90)	174 (4) ; 127 (16)	84
Furmeciclox	4.54-4.59	252 (90)	170 (8) ; 110 (20)	42
Hexytiazox	5.72-5.76	353 (90)	228 (8) ; 168 (20)	70
Imazalil	3.70-3.88	297 (130)	159 (16) ; 69 (12)	48
Indoxacarb	5.19-5.24	528 (90)	203 (40); 150 (20)	51
Iprovalicarb	3.91-3.96	321 (90)	203 (2); 119 (16)	45
Linuron	3.96-4.02	249 (90)	182 (8); 160 (12)	82
Menanipirim	4.33-4.38	224 (130)	106 (24); 77 (40)	68
Metaflumizona	5.53-5.70	507 (130)	287 (20); 178 (20)	75
Metiocarb sulfóxido	2.14-2.23	242 (90)	185 (4) ; 122 (28)	32
Metiocarb	3.86-3.91	226 (50)	169 (4) ; 121 (12)	52
Metomilo	1.66-1.80	163 (70)	106 (5); 88 (5)	69
Metoxifenoizida	4.19-4.25	369 (90)	313 (1); 149 (8)	85
Monocrotofos	1.55-1.92	224 (50)	193 (1); 127 (8)	95
Nitempiram	1.72-1.86	271 (90)	225 (4) ; 56 (36)	83
Ofurace	3.37-3.41	282 (90)	254 (4) ; 160 (20)	97
Oxamilo	1.57-1.69	242 (90)	121 (4); 72 (16)	16
Oxidemeton-methyl	1.58-1.72	247 (50)	169 (8) ; 109 (24)	54
Paclobutrazol	3.83-3.87	294 (90)	125 (40); 70 (16)	8
Pencicuron	5.02-5.06	329 (130)	330 (2); 89 (68)	13
Piperonil butóxido	5.35-5.38	356 (90)	177 (4) ; 119 (36)	20
Promecarb	3.96-4.00	208 (50)	151 (1); 109 (12)	99

Propamocarb	1.40-1.54	189 (90)	102 (16) ; 74 (24)	43
Pimetrozina	1.27-1.44	218 (90)	105 (16) ; 51 (68)	29
Simazina	2.91-2.96	202 (130)	104 (24); 68 (32)	83
Spinosad A	5.55-6.15	733 (170)	142 (28) ; 98 (72)	21
Spiridiclofen	6.30-6.35	411 (90)	313 (5); 71 (10)	85
Spiromesifen	6.18-6.23	393 (115)	295 (10)	5
		273 (110)	255 (10)	
Teflubenzuron	5.21-5.25	381 (90)	341 (4) ; 198 (16)	57
Terbutilazina	3.90-3.95	230 (90)	174 (8) ; 68 (40)	18
Tiabendazol	1.93-2.10	202 (130)	175 (24) ; 131 (36)	91
Tiacloprid	2.74-2.79	253 (90)	126 (16) ; 73 (68)	13
Tiametoxam	1.93-2.02	292 (50)	211 (8) ; 181 (16)	57
Tiodicarb	3.20-3.26	377 (170)	113 (8); 64 (12)	10
Tiofanox sulfona	2.19-2.37	251 (50)	76 (1); 57 (8)	29
Tiofanox sulfóxido	1.94-2.07	257 (90)	200 (5) ; 137 (10)	91
Tiofanox	3.31-3.37	241 (90)	184 (4) ; 57 (20)	30
Tiofanato-metil	3.01-3.05	343 (90)	311 (4); 151 (20)	34
Triazofos	4.37-4.41	314 (90)	162 (12) ; 119 (36)	20
Tricresil fosfato	4.54-4.59	253 (90)	171 (8) ; 110 (16)	61
Trifloxiestrobeno	5.21-5.26	409 (90)	186 (8) ; 145 (52)	62
Triflumizol	5.15-5.24	346 (90)	278 (4) ; 73 (8)	29
Triflumuron	4.75-4.79	359 (90)	156 (8) ; 139 (32)	55
Vamidotion	1.99-2.06	288 (50)	146 (4) ; 58 (40)	30

^a VTR: Ventana de tiempo de retención; ^b Voltaje de fragmentación indicado entre paréntesis; ^c Energía de colisión indicada entre paréntesis (eV); ^d El ion producto señalado en negrita se empleó con fines de cuantificación.

4.2. Optimización del procedimiento de extracción

4.2.1. Comparación QuEChERS americano y europeo

En primer lugar se evaluaron los resultados obtenidos mediante el empleo del QuEChERS versión europea y americana, mostrándose en la Figura 4 un esquema de ambos procedimientos, omitiendo la fase de limpieza original basada en la adición de

PSA. Para cada caso se prepararon tres fortificados a 50 µg/kg, una recta de calibrado en disolvente y otra en matriz (0, 5, 10, 50, 150 µg/L).

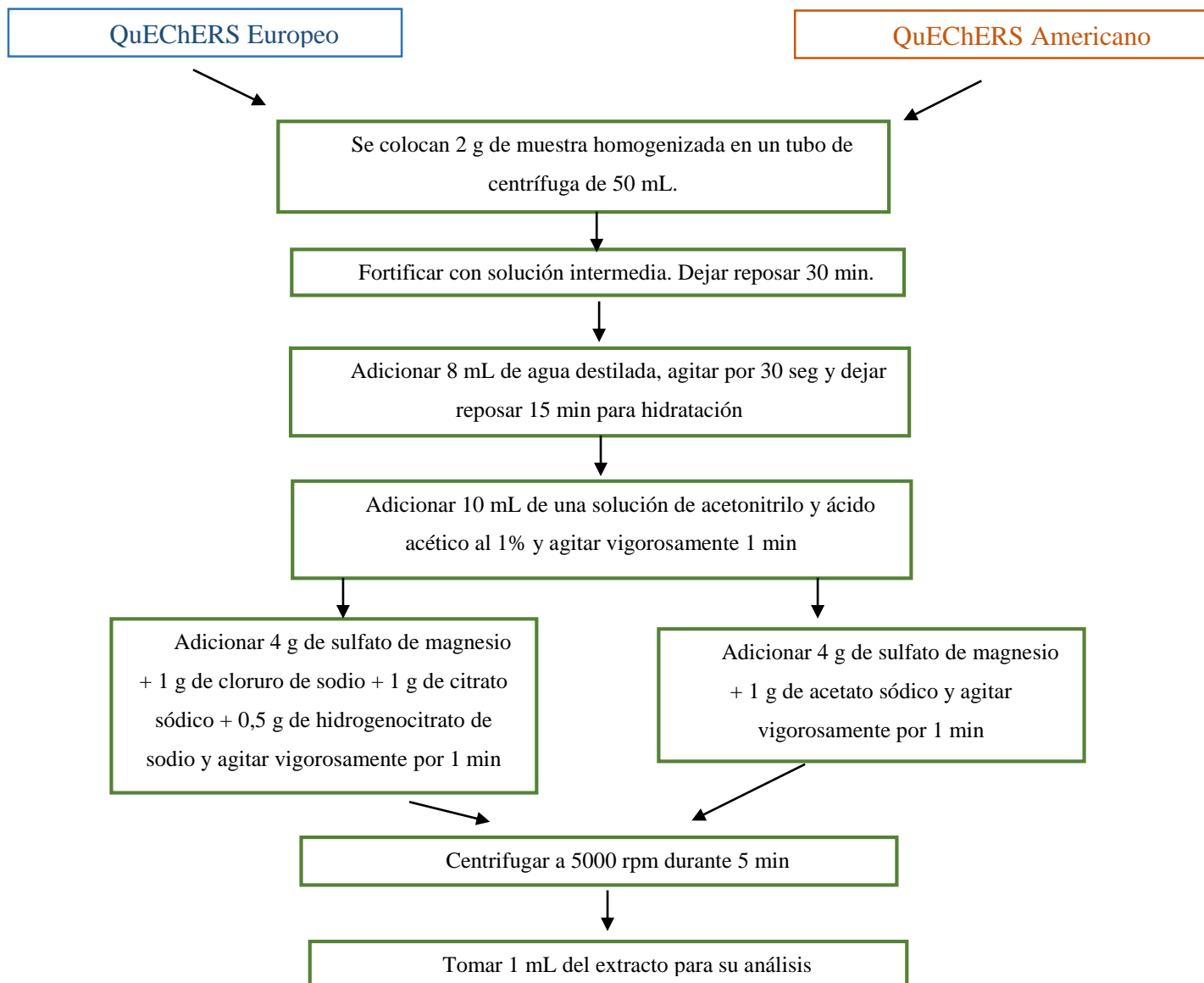


Figura 4. Esquema de extracción de QuEChERS Americano y europeo (ambos sin limpieza).

El método de extracción QuEChERS modalidad americana proporcionó los mejores resultados. Con él se extrajeron 85 plaguicidas con recuperaciones comprendidas entre el 70 y el 120 %, frente a los 44 en la modalidad europea.

A modo de ilustración, los cromatogramas de iones de la Figura 5 muestran estas diferencias. En el cromatograma TIC del método americano se distinguen más picos que en el caso del método europeo. También se puede apreciar gráficamente la presencia de efecto matriz si comparamos el orden de magnitud de los picos obtenidos en el cromatograma en disolvente con los obtenidos en los cromatogramas en matriz.

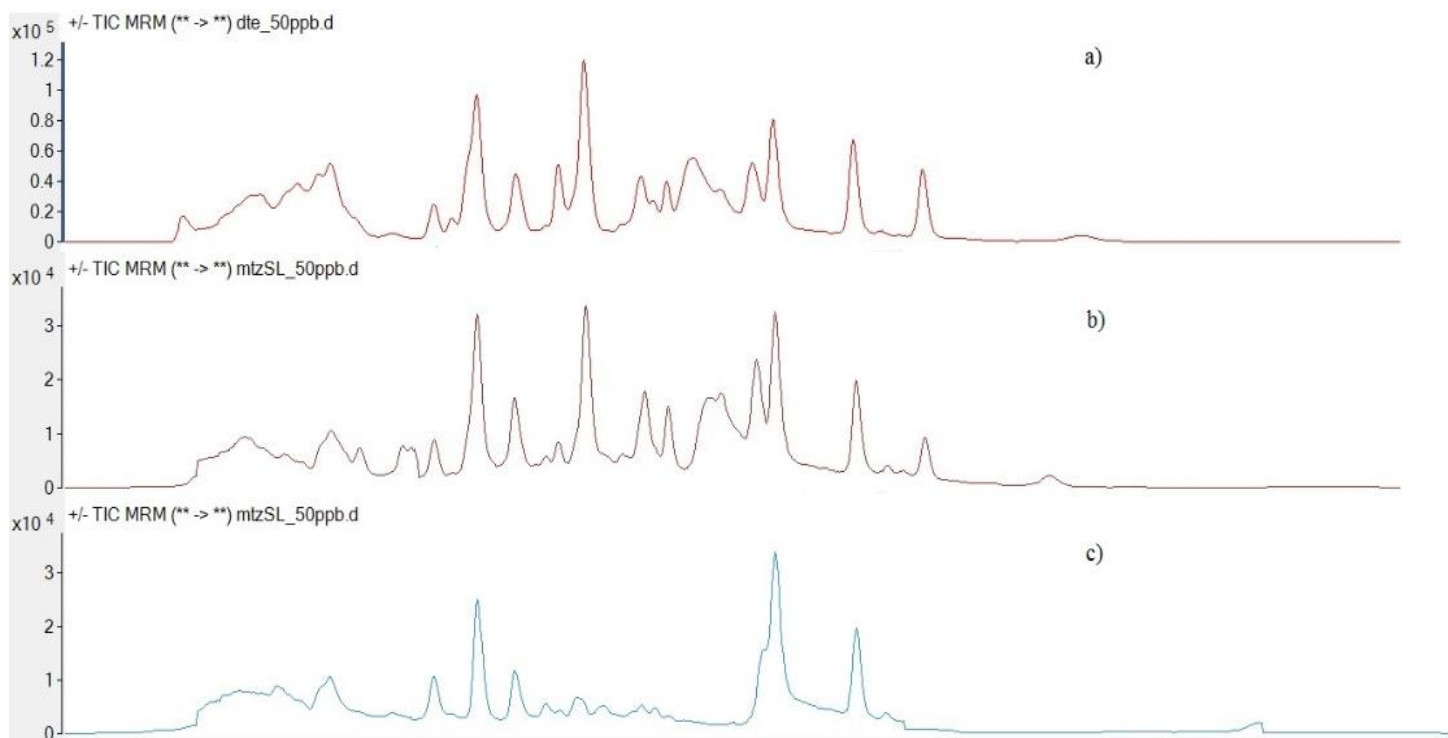


Figura 5. Cromatograma total de iones (TIC) en disolvente (a), QuEChERS americano (b) y QuEChERS europeo (c).

4.2.2. Evaluación de la etapa de limpieza

A continuación se evaluó la influencia de la etapa de limpieza sobre la extracción de plaguicidas de productos nutraceúticos. Para ello se llevó a cabo el procedimiento mostrado en la Figura 6, y los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos sin incluir dicha etapa de limpieza.

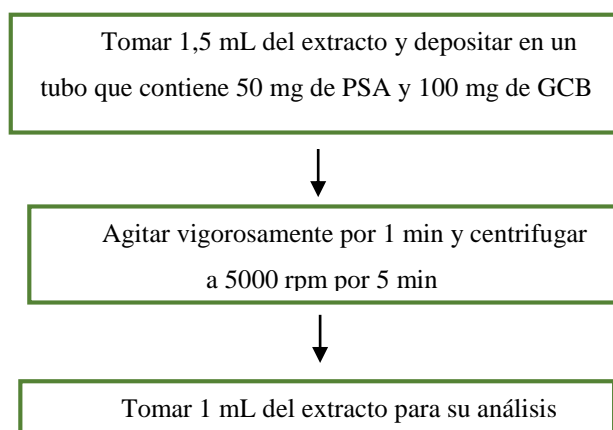


Figura 6. Etapa de limpieza en la extracción QuEChERS.

En ambos casos (con y sin limpieza) se prepararon tres fortificados a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y tres a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, así como dos curvas en matriz (una de ellas para la limpieza y otra para cuantificar los fortificados sin limpieza). Las curvas de calibración se realizaron a concentraciones más bajas (0, 2, 5, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{L}$). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3, y se puede observar que el número de compuestos extraídos a altas concentraciones (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) es superior a 80, independientemente de la adición de dicha etapa de limpieza, mientras que a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el número de compuestos extraídos es inferior a 20 utilizando ambas condiciones.

Tabla 3. Número de plaguicidas extraídos incluyendo o no etapa de limpieza.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nº de compuestos extraídos	
	Sin limpieza	Con limpieza
10	16	15
50	85	80

Tal y como muestra la Figura 7, no se observan variaciones significativas entre los resultados obtenidos aplicando u omitiendo la etapa de limpieza, con lo cual se puede prescindir de esta etapa, reduciendo la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis por muestra.

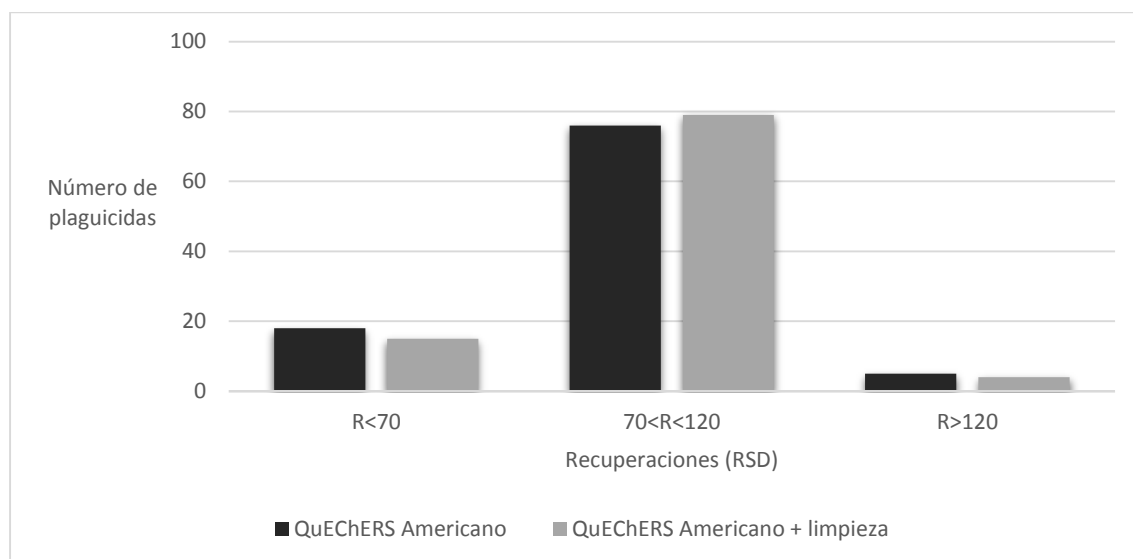


Figura 7. Número de plaguicidas con diferentes porcentajes de recuperación obtenidos aplicando QuEChERS americano con y sin limpieza. Se emplearon muestras fortificadas a 50 µg/kg.

Con objeto de intentar mejorar el número de compuestos extraídos a bajas concentraciones, seguidamente se realizó otro experimento volviendo al método europeo y comparando los resultados con y sin limpieza. En esta ocasión solo se evaluaron las recuperaciones obtenidas a bajas concentraciones (10 µg/kg), obteniéndose que el número de compuestos extraídos sin limpieza era de 42, mientras que con limpieza, el número de compuestos se reducía hasta 19.

En función de los resultados obtenidos, se decidió validar el método QuEChERS americano sin limpieza a concentraciones superiores a 10 µg/kg, ya que permitía la extracción de un mayor número de compuestos que la modalidad europea a concentraciones más altas.

Los siguientes compuestos fueron eliminados del estudio puesto que no presentaban porcentajes de recuperación aceptables: 2,6-diclorbenzamida, abamectina 1a, amitraz, azaridactina, benzoato de emamectina 1a, butoxicarboxin, cihexatin, ciprodinil, clotianidin, diclofluanida, dietofencarb, diniconazol, dodina, fenbutatin óxido, flonicamida, flufenuron, himexazol, imidacloprid, lufenuron, mecarbam, mepanipirim, metiocarb sulfona, piraclostrobina, quinosol, quinoxifen, spinosad D, tebufenocida, tebufenpirad, terbufos, triadimenol, triclorfon.

4.3. Validación del método analítico

Una vez desarrollado el método analítico, se procedió a la validación de éste, sometiéndose a la estimación de diversos parámetros como: efecto matriz, linealidad, recuperación, repetibilidad, precisión intermedia, límites de detección y cuantificación.

A. *Efecto Matriz*

A pesar de la aplicación de diferentes procedimientos de limpieza, el gran número de interferentes presentes en el té verde causan normalmente un acusado efecto matriz [14]. Éste consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental. El efecto matriz fue estudiado mediante el análisis de disoluciones de los patrones en disolvente y patrones en matriz preparados con extractos blancos de té verde a los mismos valores de concentración (0, 2, 5, 10, 50, 100 µg/L). A continuación se estimaron los cocientes de las pendientes en disolvente y en matriz, estimando que si dicho cociente era menor de 0,8 o mayor de 1,2 se considerará que se produce una supresión o un incremento de la señal analítica significativo, mientras que si dicho cociente está comprendido dentro de dicho intervalo, no se consideraría la presencia de efecto matriz [30]. En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos, y se puede observar como la relación entre la pendiente de la recta en matriz y en disolvente en la gran mayoría de plaguicidas está por debajo de 0,8, indicando la presencia de un efecto matriz acusado, en concreto provocando una supresión de la señal. Por tanto, para compensar el efecto matriz la cuantificación se llevó a cabo utilizando calibración en matriz.

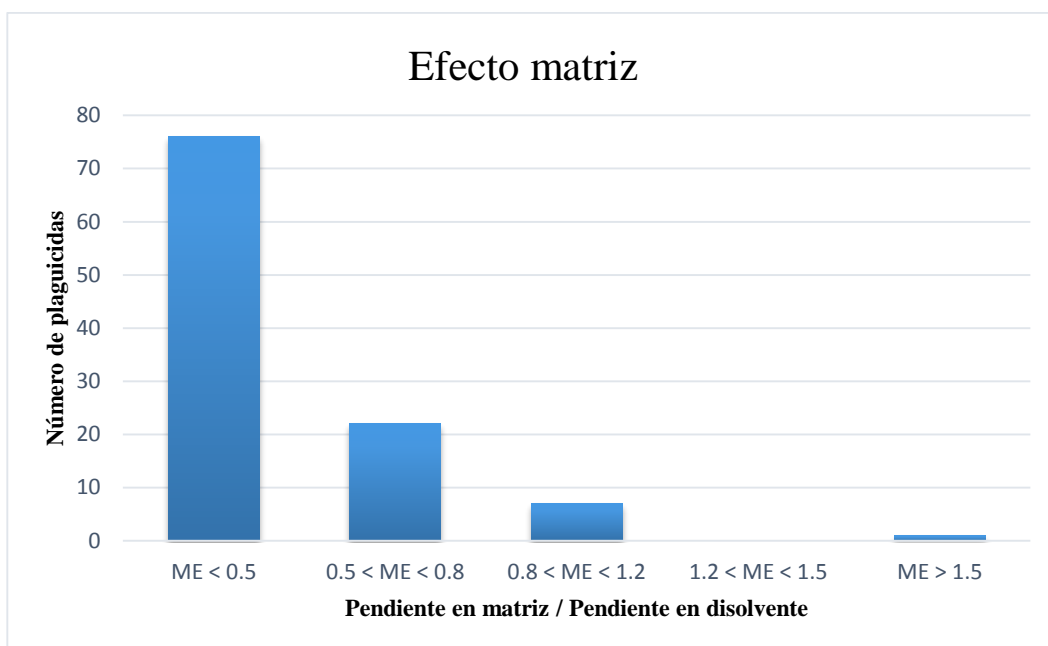


Figura 8. Plaguicidas que presentan efecto matriz (ME).

B. Linealidad

La linealidad del método se estudió a través de las curvas de calibración en matriz, entre 2 y 100 µg/kg. Las curvas de calibración se obtuvieron por mínimos cuadrados obteniendo coeficientes de determinación (r^2) superiores a 0.98 para la mayoría de los compuestos.

C. Recuperación

La recuperación de los plaguicidas también fue evaluada durante el proceso de validación mediante la fortificación de cinco replicas a cada nivel (25, 50 y 100 µg/kg). Se toman como valores adecuados aquellos que se encuentra entre 70-120 %. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Para los fortificados de 25 µg/kg el rango de recuperación oscila entre 70-119 %; entre 70-117 % para los fortificados de 50 µg/kg y entre 71-116 % para los fortificados de 100 µg/kg.

D. Repetibilidad

La repetibilidad del método se estudió al mismo nivel que la recuperación y los resultados se expresan como valores de desviación estándar relativa (*relative standard*

deviation, RSD), considerando como aceptables aquellos valores menores al 20%. En la Tabla 4 se muestran los valores de RSD (aparecen entre paréntesis) calculados a partir de valores de recuperación obtenidos a partir de 5 réplicas de cada nivel de fortificado. En el caso de los fortificados de 25 µg/kg el valor de la RSD se encuentra entre 3 y 28 %. Para el nivel de fortificado de 50 µg/kg la RSD oscila entre 2 y 22 % mientras que para el caso del fortificado de 100 µg/kg, los valores máximo y mínimo son 1 y 20 %, respectivamente.

E. Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de cinco muestras de diferentes días fortificadas a 25, 50 y 100 µg /kg. Los valores de RSD fueron inferiores al 25 % para todos los compuestos incluidos en el método propuesto, lo cual indica la estabilidad del mismo (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la validación del método desarrollado.

Plaguicida	Recuperación (%)			Precisión intermedia (%) ^b		
	25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg
8-quinolinol	106 (19) ^a	117 (18)	114 (18)	8	11	16
Acetamiprid	101 (8)	101 (12)	100 (17)	6	14	10
Aldicarb	74 (8)	85 (18)	96 (14)	9	10	14
Aldicarb sulfona	96 (13)	101 (11)	108 (12)	25	18	10
Aldicarb sulfóxido	89 (3)	97 (6)	100 (2)	9	10	13
Azaconazol	77 (12)	84 (14)	89 (4)	20	19	11
Bendiocarb	78 (6)	94 (6)	107 (4)	9	16	9
Benzoato de emamectina 1b	71 (10)	74 (11)	81 (17)	13	16	12
Bioaletrina	88 (20)	104 (12)	97 (14)	16	20	17
Bitertanol	80 (6)	90 (8)	100 (5)	20	15	10
Bromuconazol	101 (14)	94 (9)	100 (10)	19	15	11
Butocarboxim sulfóxido	89 (10)	93 (8)	103 (9)	10	14	6
Butocarboxim	73 (8)	85 (19)	96 (14)	9	10	14
Carbaril	71 (7)	91 (7)	106 (3)	18	14	13
Carbendazima	117 (4)	113 (11)	111 (7)	6	11	8

Carbofurano	85 (3)	95 (5)	103 (3)	11	10	11
Carbofurano 3-hidroxi	104 (14)	99 (10)	110 (6)	16	19	11
Clorantranipol	84 (20)	88 (10)	98 (8)	18	11	8
Cloridazona	112 (17)	98 (13)	114 (8)	8	13	16
Clofentizin	87 (19)	78 (12)	88 (20)	23	14	14
Cumafos	91 (19)	100 (19)	92 (15)	5	14	11
Ciromazina	76 (5)	78 (7)	71 (5)	16	5	14
Demeton-S-metil	117 (18)	100 (3)	111 (10)	23	16	7
Desmetrina	84 (4)	90 (4)	97 (2)	7	10	11
Diclobutrazol	78 (9)	95 (5)	102 (2)	11	14	13
Dicrotofos	86 (15)	89 (8)	100 (5)	16	16	13
Diflubenzuron	78 (28)	84 (25)	94 (15)	19	10	16
Difenilamina	71 (10)	93 (11)	90 (17)	15	12	19
Disulfoton sulfona	82 (18)	98 (14)	108 (12)	22	14	10
Disulfoton sulfóxido	85 (7)	100 (4)	103 (3)	4	10	7
Diuron	77 (17)	83 (11)	97 (6)	15	15	10
Epoconazol	78 (11)	93 (7)	97 (10)	4	5	14
Espiroxamina	84 (7)	86 (5)	89 (6)	8	12	11
Etiofencarb sulfona	92 (13)	98 (8)	107 (9)	16	13	10
Etiofencarb sulfóxido	95 (10)	87 (8)	99 (8)	19	9	6
Etoxiquina	87 (4)	87 (5)	94 (2)	21	13	10
Etofenprox	114 (19)	86 (22)	81 (8)	10	11	11
Etoxazol	73 (13)	80 (8)	90 (4)	17	14	12
Fenazaquin	81 (9)	84 (6)	89 (1)	14	11	9
Fenbuconazol	82 (16)	94 (7)	101 (4)	13	16	8
Fenhexamida	103 (9)	88 (14)	95 (5)	10	11	16
Fenmedifam	78 (12)	96 (6)	102 (7)	9	11	7
Fenpropidin	98 (8)	102 (13)	110 (19)	22	15	14
Fenpropimorf	81 (7)	83 (6)	89 (5)	4	12	12
Fenpiroximat	73 (11)	82 (5)	93 (4)	18	14	11
Fensulfotion	88 (14)	102 (7)	102 (7)	8	10	18
Flubendiamida	115 (15)	100 (14)	109 (13)	19	13	12
Flufenoxuron	71 (14)	74 (6)	90 (12)	16	18	19
Fluquinconazol	96 (12)	96 (15)	103 (19)	10	17	15

Flusilazol	76 (5)	90 (9)	99 (8)	16	16	11
Flutolanil	72 (12)	85 (8)	101 (15)	15	19	20
Flutriafol	77 (13)	92 (10)	100 (7)	9	5	13
Forclorfenuron	75 (6)	83 (6)	92 (5)	10	13	13
Formetanato	88 (6)	99 (4)	106 (3)	7	8	8
Fosfamidon	86 (5)	93 (4)	102 (3)	4	8	6
Furmecicloz	73 (6)	81 (9)	90 (5)	13	18	14
Hexythiazox	77 (19)	87 (7)	97 (7)	13	22	17
Imazalil	82 (5)	79 (2)	97 (4)	11	11	16
Indoxacarb	89 (19)	88 (10)	98 (6)	13	20	14
Iprovalicarb	78 (6)	95 (4)	104 (4)	7	12	12
Linuron	109 (19)	89 (10)	109 (18)	23	16	9
Menanipirim	88 (13)	92 (5)	98 (4)	5	14	10
Metaflumizona	83 (18)	84 (5)	87 (18)	17	20	12
Metiocarb sulfóxido	88 (9)	85 (8)	99 (8)	9	11	8
Metiocarb	77 (10)	94 (8)	105 (3)	16	13	16
Metomilo	119 (6)	98 (8)	104 (11)	7	7	8
Metoxifenoziata	91 (9)	97 (7)	100 (5)	3	11	15
Monocrotofos	76 (16)	81 (19)	87 (9)	15	10	19
Nitempiram	82 (10)	87 (13)	93 (10)	13	9	4
Ofurace	83 (6)	97 (5)	106 (5)	13	8	10
Oxamilo	73 (14)	98 (20)	114 (12)	12	6	9
Oxidemeton-metil	108 (14)	110 (14)	116 (9)	9	10	10
Paclobutrazol	80 (4)	91 (6)	99 (5)	16	10	11
Pencicuron	70 (7)	78 (9)	93 (15)	11	12	13
Piperonil butóxido	75 (16)	83 (9)	94 (4)	18	13	13
Promecarb	86 (7)	98 (6)	103 (3)	9	8	10
Propamocarb	80 (3)	99 (4)	106 (2)	17	14	16
Pimetrozina	71 (4)	70 (7)	73 (4)	20	16	14
Simazina	92 (8)	92 (5)	95 (7)	17	12	6
Spinosad A	73 (10)	73 (13)	81 (6)	19	6	8
Spirodiclofen	74 (4)	75 (12)	86 (4)	15	7	18
Spiromesifen	71 (20)	77 (10)	88 (8)	20	18	12
Teflubenzuron	81 (8)	78 (20)	82 (14)	14	11	19
Terbutilazina	82 (5)	90 (7)	101 (4)	15	8	15
Tiabendazol	88 (9)	82 (15)	83 (16)	9	12	18

Tiacloprid	76 (16)	85 (8)	102 (7)	18	7	16
Tiametoxam	101 (17)	104 (11)	101 (10)	7	14	13
Tiodicarb	90 (15)	91 (8)	95 (6)	6	13	7
Tiofanox	71 (19)	90 (11)	101 (5)	11	8	6
Tiofanox sulfona	83 (17)	97 (14)	105 (16)	11	10	8
Tiofanox sulfóxido	104 (12)	106 (20)	109 (16)	17	7	10
Tiofanato-metil	71 (14)	72 (20)	71 (8)	11	16	17
Triazofos	97 (4)	100 (4)	106 (4)	7	10	12
Fosfato de tricresilo	75 (19)	76 (12)	90 (4)	12	7	18
Trifloxiestrobeno	73 (10)	85 (7)	102 (4)	19	15	14
Triflumizol	75 (16)	82 (7)	88 (11)	12	12	9
Triflumuron	94 (15)	81 (15)	83 (13)	22	20	16
Vamidotion	82 (6)	93 (9)	103 (5)	16	15	9

^a Valores de RSD aparecen entre paréntesis (n = 5); ^b n= 5

F. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron calculados analizando patrones en matriz a concentraciones 0,2, 0,5, 1,0 2,0 y 5,0 µg/kg. Se determinaron como la concentración de analito más baja que proporcionaba una señal/ruido (S/N) de 3 y 10 para LOD y LOQ, respectivamente. Conjuntamente, se usaron algunos criterios de tipo más cualitativo para asegurar la elección correcta de los límites, por ejemplo: buena resolución de picos cromatográficos, correlación correcta entre concentraciones y áreas de pico, y mayor relación señal/ruido al aumentar la concentración. Los resultados se reflejan en la Tabla 5. Los límites de detección y cuantificación se sitúan en un rango de entre 0,2-10 µg/kg y 0,5-25 µg/kg (máximos y mínimos, respectivamente). Éstos no son niveles suficientemente bajos para lo que se podría requerir a la hora de legislar este tipo de productos nutraceúticos, con lo que sería conveniente una mejora en la optimización del método para poder validarlo a niveles más bajos de detección y cuantificación.

Tabla 5. Límites de detección y cuantificación.

Plaguicida	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
8-quinolinol	10,0	25,0
Acetamiprid	10,0	25,0
Aldicarb	1,0	2,0
Aldicarb sulfona	10,0	25,0
Aldicarb sulfóxido	5,0	10,0
Azaconazol	10,0	25,0
Bendiocarb	2,0	5,0
Benzoato de emamectina 1b	2,0	5,0
Bioaletrina	10,0	25,0
Bitertanol	5,0	10,0
Bromuconazol	10,0	25,0
Butocarboxim sulfóxido	1,0	2,0
Butocarboxim	1,0	2,0
Carbaril	5,0	10,0
Carbendazima	1,0	2,0
Carbofurano	0,2	0,5
Carbofurano 3-hidroxi	10,0	25,0
Clorantranipol	10,0	25,0
Cloridazona	10,0	25,0
Clofentizin	10,0	25,0
Cumafos	10,0	25,0
Ciromazina	2,0	5,0
Demeton-S-methyl	10,0	25,0
Desmetrina	0,2	0,5
Diclobutrazol	5,0	10,0
Dicrotofos	10,0	25,0
Diflubenzuron	10,0	25,0
Diphenylamine	1,0	2,0
Disulfoton sulfona	10,0	25,0
Disulfoton sulfóxido	5,0	10,0
Diuron	5,0	10,0
Epoxiconazol	5,0	10,0

Espiroxamina	2,0	5,0
Etiofencarb sulfona	10,0	25,0
Etiofencarb sulfóxido	10,0	25,0
Etoxiquina	2,0	5,0
Etofenprox	10,0	25,0
Etoxazol	0,2	0,5
Fenazaquin	1,0	2,0
Fenbuconazol	5,0	10,0
Fenhexamida	5,0	10,0
Fenmedifam	2,0	5,0
Fenpropidin	10,0	25,0
Fenpropimorf	5,0	10,0
Fenpiroximat	0,5	1,0
Fensulfotion	5,0	10,0
Flubendiamida	10,0	25,0
Flufenoxuron	10,0	25,0
Fluquinconazol	10,0	25,0
Flusilazol	1,0	2,0
Flutolanil	5,0	10,0
Flutriafol	1,0	2,0
Forclorfenuron	2,0	5,0
Formetanato	5,0	10,0
Fosfamidon	1,0	2,0
Fosfato de tricresilo	5,0	10,0
Furmeciclox	1,0	2,0
Hexytiazox	10,0	25,0
Imazalil	5,0	10,0
Indoxacarb	5,0	10,0
Iprovalicarb	2,0	5,0
Linuron	10,0	25,0
Menanipirim	10,0	25,0
Metaflumizona	10,0	25,0
Metiocarb sulfóxido	10,0	25,0
Metiocarb	5,0	10,0
Metomilo	1,0	2,0

Metoxifenoza	5,0	10,0
Monocrotofos	10,0	25,0
Nitempiram	10,0	25,0
Ofurace	5,0	10,0
Oxamilo	5,0	10,0
Oxidemeton-metil	10,0	25,0
Paclobutrazol	2,0	5,0
Pencicuron	10,0	25,0
Piperonil butóxido	0,2	0,5
Promecarb	1,0	2,0
Propamocarb	1,0	2,0
Pimetrozina	5,0	10,0
Simazina	2,0	5,0
Spinosad A	5,0	10,0
Spiroclufen	5,0	10,0
Spiromesifen	2,0	5,0
Teflubenzuron	10,0	25,0
Terbutilazina	2,0	5,0
Tiabendazol	1,0	2,0
Tiacloprid	5,0	10,0
Tiametoxam	10,0	25,0
Tiodicarb	1,0	2,0
Tiofanox	1,0	2,0
Tiofanox sulfona	10,0	25,0
Tiofanox sulfóxido	1,0	2,0
Tiofanato-metil	10,0	25,0
Triazofos	2,0	5,0
Trifloxiestrobena	1,0	2,0
Triflumizol	0,5	1,0
Triflumuron	10,0	25,0
Vamidotion	5,0	10,0

4.4. Análisis de muestras reales

El método validado fue aplicado al análisis de 10 muestras de comprimidos nutraceúticos de té verde adquiridos en diferentes comercios locales. Todas las muestras fueron extraídas mediante el método de extracción optimizado. Durante el análisis de las muestras se realizó un control de calidad interno, que implicaba la inyección de una recta de calibrado en matriz, una disolución estándar de los compuestos en disolvente, un blanco y tres fortificados a distinto nivel (25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

En las muestras analizadas se encontraron residuos de acetamiprid en las muestras 1 y 3 a unas concentraciones de 56,2 y 56,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. El plaguicida carbendazima se halló en la muestra real número 8 a una concentración de 13,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Estos resultados son consecuentes ya que las muestras 1 y 3 son comprimidos de té verde de la misma marca comercial. Además, estudios previos [15] ya habían informado de residuos de estos plaguicidas en muestras de té verde.

A modo de confirmación, en las Figuras 9 y 10 se muestran los cromatogramas obtenidos en la muestra reales para cada plaguicida con los cromatogramas de ese mismo plaguicida en un punto en matriz a una concentración similar a la obtenida en la muestra real correspondiente. En la Figura 9 se muestran los cromatogramas correspondientes a los positivos de acetamiprid, así como de un punto en matriz a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que en la Figura 10 se muestra el positivo de carbendazima junto a un punto en matriz a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

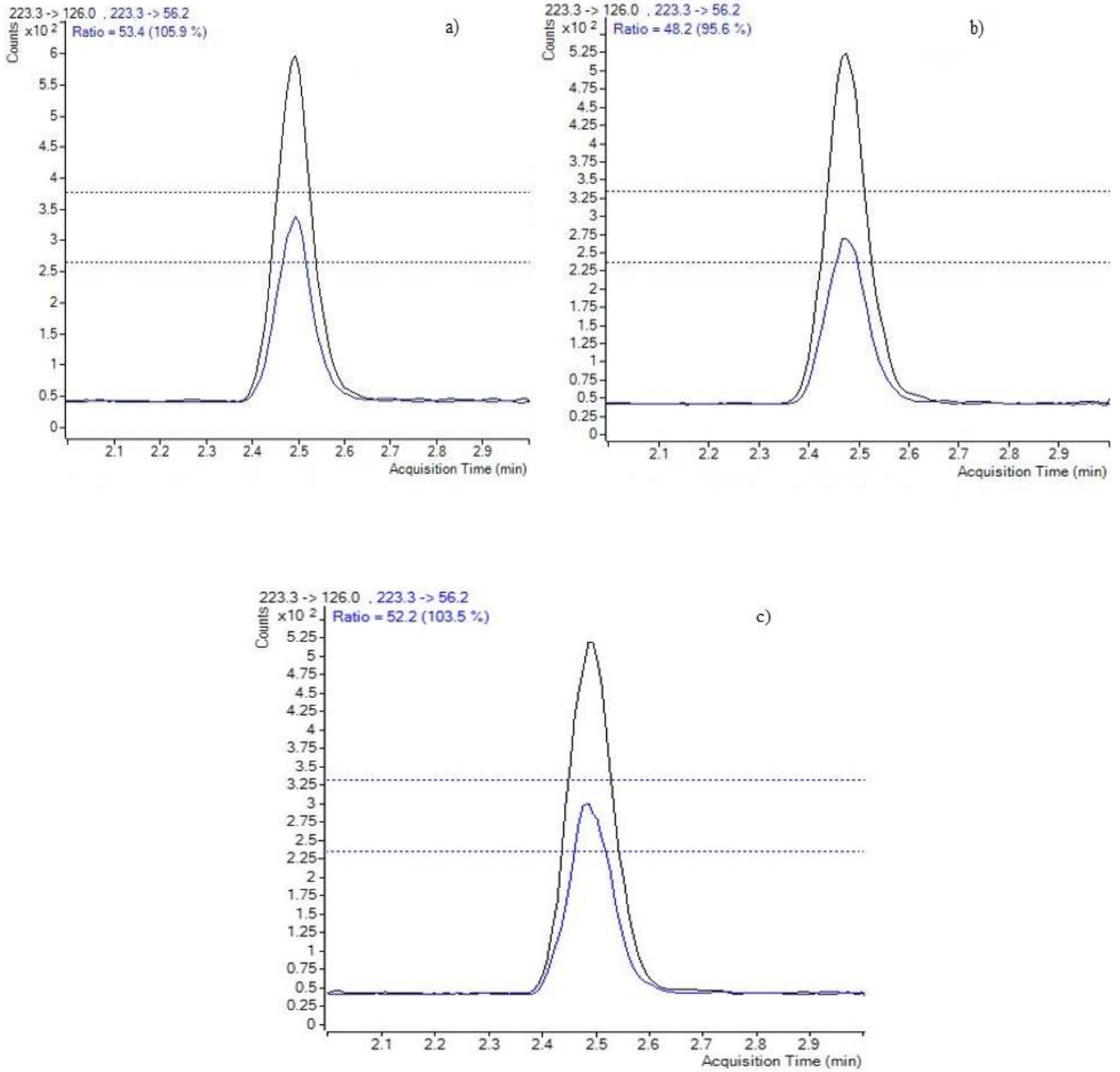


Figura 9. UHPLC-MS/MS cromatogramas para a) Muestra 1 conteniendo 56,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acetamiprid; b) Muestra 3 conteniendo 56,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acetamiprid y c) Punto en matriz de acetamiprid a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (En azul la línea de confirmación y en negro la curva de cuantificación).

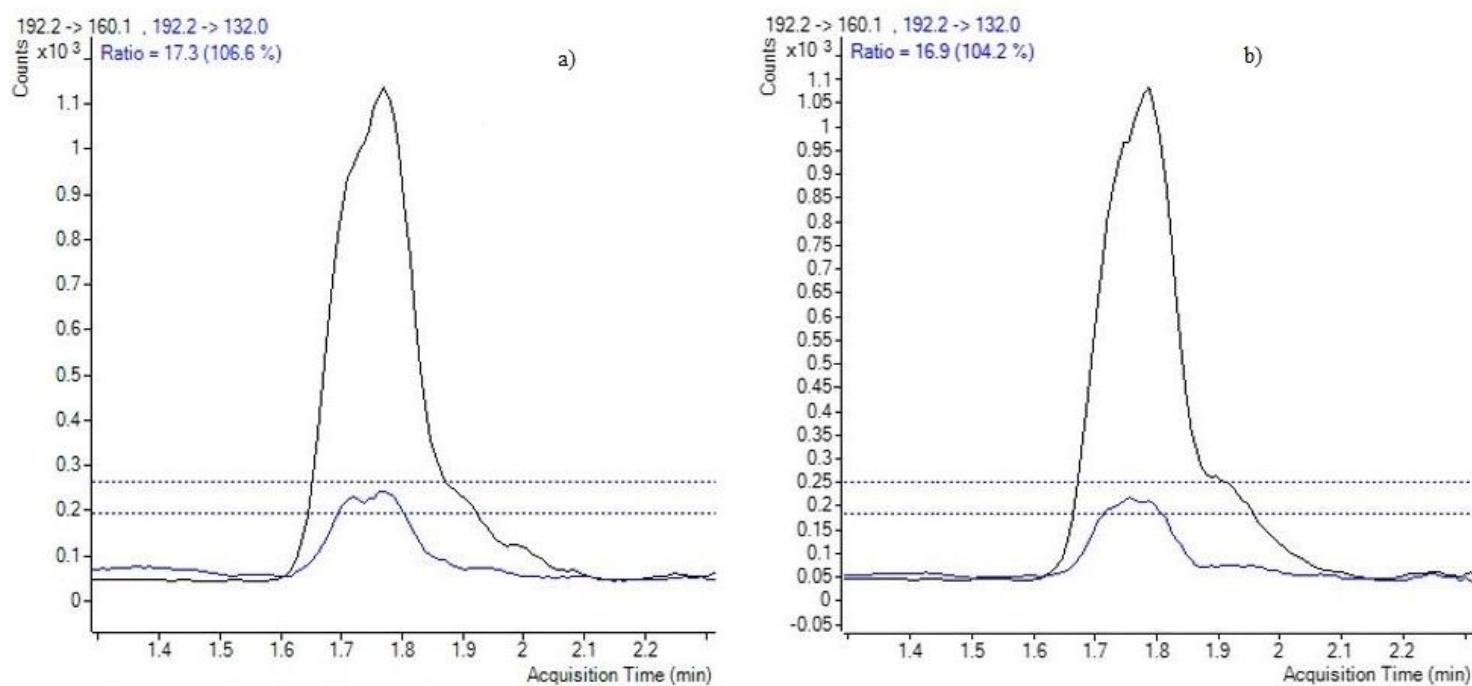


Figura 10. UHPLC-MS/MS cromatogramas obtenidos para a) Muestra real 8 conteniendo 13,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de carbendazima y b) Punto en matriz de carbendazima a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (En azul la línea de confirmación y en negro la curva de cuantificación).

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas a partir de la elaboración del presente trabajo fin de máster son las siguientes:

- ✓ Se ha desarrollado y optimizado un método para el análisis de plaguicidas en nutraceúticos procedentes de té verde mediante UHPLC-MS/MS empleando el método QuEChERS como procedimiento de extracción.
- ✓ El proceso de validación a los niveles de concentración elegidos fue satisfactorio y se obtuvieron buenos resultados para los parámetros estudiados (linealidad, recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y límites de detección y cuantificación).
- ✓ Es un método útil para su aplicación en análisis de rutina por su sencillez y rapidez (11 minutos por muestra).
- ✓ Los niveles de concentración para la validación del método son altos con respecto a los límites que podría establecer una futura legislación en este tipo de productos.
- ✓ El método se aplicó a diez muestras reales de comprimidos de té verde obteniendo varios resultados positivos, es decir, presencia de residuos de plaguicidas, en algunas de ellas, poniendo de manifiesto la necesidad del control de residuos de plaguicidas en este tipo de productos.

6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACION DEL TRABAJO

- ✓ Mejorar la optimización del método y conseguir una mayor sensibilidad para poder validarlo a niveles más bajos (al menos 10 µg/kg) que se ajusten a una futura regulación que incluya residuos de plaguicidas en productos nutraceúticos.

- ✓ Evaluar la validez del método desarrollado a la hora de analizar comprimidos nutraceúticos procedentes de otras matrices tales como té rojo, alcachofa, alfalfa, valeriana o diente león entre otros.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Organización para la Agricultura y Alimentación. www.fao.org (último acceso Junio 2013).

[2] European Food Safety Authority (EFSA). www.efsa.europa.eu (último acceso Junio 2013).

[3] Organización Mundial de la Salud (WHO). <http://www.who.int/es/> (último acceso Junio 2013).

[4] R. Romero González, J. L. Fernández Moreno, P. Plaza Bolaños, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, *Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria*, Revista Española de Salud Pública (2007) 81, pp. 461-474.

[5] S. H. Zeisel, *Regulation of "Nutraceuticals"*, Science (1999) 285, pp. 1853-1855.

[6] D. Bagchi, H.G. Preuss, J.P. Kehrler, *Nutraceutical and functional food industries: Aspects on safety and regulatory requirements*, Toxicology Letters (2004) 150, pp. 1-2.

[7] V. Lattanzio, P.A. Kroon, V. Linsalata, A. Cardinali, *Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients*, Journal of Functional Foods (2009) 1, pp. 131-144.

[8] Food and Drug Administration (FDA). www.fda.gov/Food/DietarySupplements (último acceso Junio 2013).

[9] H.N. Graham, *Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry Preventive Medicine* (1992) 21, pp. 334-350.

[10] S. Shankar, S. Ganapathy, R.K. Srivastava, *Green tea polyphenols: Biology and therapeutic implications in cancer*, Frontiers in Bioscience (2007) 12, pp. 4881-4899.

[11] A.G. Dulloo, C. Duret, D. Rohrer, L. Girardier, N. Mensi, M. Fathi, P. Chantre, J. Vandermander, *Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans*, American Journal of Clinical Nutrition (1999) 70, pp. 1040-1045.

[12] L. Álvarez, *Cómo cura el té verde*, 1ª edición, RBA Libros (2012), pp. 25-33

[13] T. Pan, J. Jankovic, W. Le, *Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease*, Drugs Aging (2003) 20, pp. 711-721.

[14] L. Rajski, A. Lozano, N. Belmonte-Valles, A. Uclés, S. Uclés, M. Mezcua, A.R. Fernandez-Alba, *Comparison of three multiresidue methods to analyse pesticides in green tea with liquid and gas chromatography/tandem mass spectrometry*. *Analyst* (2013) 138, pp. 921-93.

[15] G. Chen, P. Cao, R. Liu, *A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure*, *Food Chemistry* (2011) 125, pp. 1406-1411.

[16] A. Wilkowska, M. Biziuk, *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*, *Food Chemistry* (2011) 125, pp. 803-812.

[17] Y. Chen, F. Al-Taher, R. Juskelis, J.W. Wong, K. Zhang, D.G. Hayward, J. Zweigenbaum, J. Cappozzo, *Multiresidue pesticide analysis of dried botanical dietary supplements using an automated dispersive SPE cleanup for QuEChERS and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2012) 60, pp. 9991-9999.

[18] S.J. Lehotay, K.A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon, *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables*, *Journal of Chromatography A* (2010) 1217, pp. 2548-2560.

[19] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, *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, pp. 412-431.

[20] S.J. Lehotay, M. O'Neil, J. Tully, A.V. García, M. Contreras, H. Mol, V. Heinke, A. Parker, *Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study*, *Journal of AOAC International* (2007) 90, pp. 485-520.

[21] L. Li, W. Li, D. Qin, S. Jiang, F. Liu, *Application of graphitized carbon black to the quechers method for pesticide multiresidue analysis in Spinach*, *Journal of AOAC International* (2009) 92, pp. 538-547.

[22] B. Benthin, H. Danz, M. Hamburger, *Pressurized liquid extraction of medicinal plants*, *Journal of Chromatography A* (1999) 837, pp. 211-219.

- [23] M.C. Hennion, *Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*, Journal of Chromatography A (1999) 856, pp. 3-54.
- [24] S.A. Barker, *Matrix solid phase dispersion (MSPD)*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods (2007) 70, pp. 151-162.
- [25] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*, Journal of Chromatography A (2000) 880, pp. 35-62.
- [26] M.J. G. García, M. C. Q. Mani, M. P. da Silva de Campos, *Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución*, Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid, ediciones UAM (2009). Capítulo 3, p.37.
- [27] R. E. Adrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons (2003). Capítulo 4, pp. 122-126
- [28] C. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley Interscience (2007) Capítulo 2, pp. 48-54.
- [29] F. G. Kitson, B. S. Larsen, C. N. McEwen, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, Academic Press, Elsevier (1996).
- [30] K. Danzer, M. Otto, L.A. Currie, *Guidelines for calibration in analytical chemistry Part 2. Multispecies calibration*, Pure and applied chemistry (2004) 76, pp. 1215-1225.