



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Hidrología y Química Analítica

*Máster Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas y
Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental*

Trabajo Fin de Máster:

**“DETERMINACIÓN DE COLORANTES
ALIMENTARIOS EN PRODUCTOS
ALIMENTICIOS DEL MAR”**

Julio 2011

Autora: *Noelia López Gutiérrez*

Tutores: *Patricia Plaza Bolaños y Roberto Romero González*

TRABAJO FIN DE MASTER

El presente trabajo ha sido presentado por Noelia López Gutiérrez, correspondiente al Máster Universitario Oficial: *Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental.*

Fdo: Noelia López Gutiérrez

Tutores

Fdo: Patricia Plaza Bolaños

Fdo: Roberto Romero González

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a Antonia Garrido Frenich, directora del máster, por haberme aportado información sobre éste, consiguiendo que me embarcase en esta nueva etapa de mi formación académica. En segundo lugar, debo de agradecer especialmente la gran paciencia que ha demostrado conmigo Roberto Romero González, así como la inestimable ayuda de Patricia Plaza Bolaños a lo largo de esta investigación.

Igualmente, ha resultado de gran importancia la gran ayuda, comprensión y consejos, que han tenido conmigo en todo momento especialmente Maribel Alarcón y Rocío Cazorla en lo referente al funcionamiento del UHPLC y a mis numerosas dudas, así como del resto de compañeros del laboratorio (Renata Pereira, Nieves Barco, María Luz Gómez, Juan Padilla y María del Mar Aguilera), sin los cuales nada hubiese sido igual, cuya presencia ha hecho que todo sea mucho más fácil y divertido. Es importante mencionar la gran colaboración de Elena Pérez (becaria de colaboración) y Noelia M. Valera en gran parte de las experiencias realizadas.

Asimismo, debo de mencionar a mis amigos (Sandra Rodríguez, Juan Pedro Belmonte, Ana María García y María José Manrique) cuyo apoyo es siempre muy importante tanto en mi vida personal como profesional, sin olvidar a Anne Le Bretonchel (compañera de piso) por saber escuchar. Pero más especialmente debo de agradecer a mi amiga Patricia Vasco todo lo que ha tenido que soportar (tanto logros como dificultades acontecidas) al ser mi compañera de piso a lo largo del desarrollo de esta investigación, siendo capaz de aportarme las fuerzas necesarias en momentos difíciles para no rendirme y seguir trabajando.

Finalmente, agradecer a las personas más importantes que forman parte de mi vida, mis padres sin cuyo constante apoyo y ánimo esto no hubiese sido posible.

ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN	6
II. MEMORIA CIENTÍFICA	10
2.1. Objeto y campo de aplicación del estudio	10
2.2. Planteamiento del problema y justificación.....	11
2.3. Introducción	12
2.3.1. Acuicultura y colorantes	12
2.3.2. Legislación	17
2.3.3. Determinación de colorantes en productos del mar	19
III. EXPERIMENTAL	25
3.1. Reactivos y materiales.....	25
3.1.1. Reactivos	25
3.1.2. Materiales	25
3.2. Equipos.....	26
3.2.1. UHPLC-QqQ-MS/MS	26
3.2.2. Otros equipos	26
3.3. Análisis cromatográfico	26
3.4. Determinación mediante MS/MS	27
3.5. Procedimiento de extracción.....	27
3.6. Muestras empleadas	28
3.7. Procedimiento de validación.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Optimización del análisis a través de UHPLC-MS/MS	30
4.1.1. Optimización de la separación cromatográfica.....	34
4.2. Optimización del procedimiento de extracción.....	40
4.3. Evaluación del efecto matriz	48
4.4. Validación del método analítico	49
4.5. Análisis de muestra reales.....	53
V. CONCLUSIONES	54
VI. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	55
VII. REFERENCIAS	56

I. PRESENTACIÓN

El Máster Universitario Oficial “*Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental*”, se encuentra constituido por 60 créditos ECTS, distribuidos en 5 módulos temáticos. Los tres primeros módulos poseen un contenido teórico, mientras que el cuarto módulo tiene un carácter práctico, siendo el quinto módulo el que corresponde a la realización del Trabajo Fin de Máster.

A continuación, se describe el contenido de los distintos módulos:

MÓDULO I: PLAGUICIDAS

El módulo 1 se encuentra constituido por las siguientes asignaturas:

1. Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos, cursada).
2. Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos, cursada).
3. Registro de plaguicidas (3 créditos, cursada).
4. Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos, cursada).

A través de este módulo se adquieren conocimientos en primer lugar sobre cuestiones relacionadas con las propiedades de los plaguicidas, así como de las diferentes técnicas y equipos que se emplean para la aplicación de tratamientos fitosanitarios. Posteriormente, se abordaron diferentes aspectos de la seguridad alimentaria y del control de contaminantes y residuos de plaguicidas en alimentos. Más tarde, se incidió en el aprendizaje de los estudios que son realizados para la autorización y registro de fitosanitarios, además de conocer las fuentes de información que permiten obtener las normativas más actuales. Finalmente, se abordaron los distintos tipos de formulaciones de liberación controlada y algunas de sus diferentes aplicaciones agronómicas.

MÓDULO II: CONTAMINANTES

El módulo 2 se encuentra constituido por las siguientes asignaturas:

1. Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos, cursada).
2. Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos, cursada).
3. Contaminación y remediación de suelos (3 créditos, cursada).

En este módulo se abordaron conceptos como calidad, fraude alimentario, seguridad alimentaria y sistemas de trazabilidad. Después, se pasó a estudiar conceptos toxicológicos, adquiriendo conocimientos sobre las propiedades toxicocinéticas y toxicodinámicas de multitud de sustancias que pueden encontrarse en los alimentos. Finalmente, el módulo fue enfocado a informarnos sobre la contaminación de suelos por fertilizantes y metales pesados. Además, se dieron a conocer las medidas de remediación de suelos y tratamientos de aguas contaminadas que existen.

MÓDULO III: GESTIÓN DE LABORATORIOS

El módulo 3 se encuentra constituido por las siguientes asignaturas:

1. Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos, convalidada).
2. Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos, convalidada).
3. Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos, cursada).

En este módulo los conocimientos teóricos se centraron en cuestiones relacionadas con las formas que existen de diseñar y realizar un muestreo, y de todos los procesos que implican una adecuada preparación de la muestra (etapas de separación y/o preconcentración). Asimismo, se han expuesto las herramientas necesarias para llevar a cabo un adecuado control de calidad, dando especial importancia a la validación de los métodos y cálculos estadísticos que permitan la comparabilidad de las medidas. Finalmente, se incide sobre los sistemas de gestión de calidad de laboratorios, asignatura que muestra toda la normativa (ISO 9001, ISO 14001, ISO 17020, ISO 17025 y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs)) que conlleva la implantación de estos sistemas, así como todo lo referente a la gestión del personal o los procedimientos de evaluación de calidad basados en el sistema de auditorías.

MÓDULO IV: EXPERIMENTACIÓN EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

El módulo 4 se encuentra constituido por las siguientes asignaturas:

1. Espectrometría de masas (3 créditos, convalidada).
2. Exposición a plaguicidas (3 créditos, cursada).
3. Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos, cursada).

Este módulo nos ha aportado en primer lugar una base general sobre la espectrometría de masas, para más tarde profundizar en los distintos tipos de ionización,

tipos de analizadores o modos de operación existentes. Luego, se nos instruyó en conocer y evaluar los riesgos para la salud humana derivados del uso de plaguicidas, a través de la exposición potencial dérmica y respiratoria a plaguicidas en lugares de trabajo. Y por último, se hizo una descripción de los equipos empleados habitualmente para el análisis de plaguicidas y otros contaminantes mediante técnicas cromatográficas. En esta última asignatura hay una parte práctica que permitía adquirir cierta destreza en la utilización de equipos como cromatógrafos de gases (GC) o líquidos (LC) con distintos detectores, trabajando diferentes técnicas de ionización, y optimizando parámetros instrumentales básicos de la separación cromatográfica (GC y LC) y de la determinación espectrométrica (tanto en MS simple como en tándem, MS/MS). Además se hizo una descripción de las técnicas más avanzadas para el análisis de plaguicidas y contaminantes usando detectores de masas en tándem y analizadores de alta resolución como Exactive-Orbitrap.

MÓDULO V: PROYECTO

El presente trabajo fin de Máster denominado: “*Determinación de colorantes alimentarios en productos alimenticios del mar*”, se ha desarrollado en el Grupo de Investigación “*Química Analítica de Contaminantes*”, correspondiente al Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería.

A través de la realización de este trabajo de investigación se ha adquirido una serie de habilidades y conocimientos que me han permitido:

- Buscar información y legislación concerniente al tema de estudio del trabajo científico realizado.
- Desarrollar y validar métodos cromatográficos de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS).
- Evaluar los distintos parámetros que influyen en el proceso de extracción de los colorantes presentes en productos del mar.
- Realizar un adecuado tratamiento de los datos analíticos, a través de los cuales se pueden extraer conclusiones de las distintas experiencias realizadas.

Finalmente, se debe destacar que la realización de las distintas materias cursadas a lo largo del año en el Máster, así como toda la investigación que ha implicado la

realización del Trabajo Fin de Máster, ha mejorado mi capacidad de planificación y organización fundamentada en criterios de calidad y eficacia, lo cual me resultará de gran importancia para mi desarrollo profesional en el futuro.

II. MEMORIA CIENTÍFICA

2.1. Objeto y campo de aplicación del estudio

Los colorantes artificiales tales como verde de malaquita, verde de leucomalaquita, cristal violeta o verde brillante, son utilizados no solo por sus propiedades de tinción sino que además resultan ser excelentes agentes antimicrobianos, lo cual fomenta su uso en determinados alimentos para evitar o curar determinadas infecciones, pudiendo desencadenar un problema para la salud de las personas.

El objetivo del presente trabajo es la determinación de los colorantes anteriormente mencionados en productos alimenticios procedentes del mar, concretamente en gamba. Para ello, se pretende desarrollar métodos de tratamiento de muestra que permitan minimizar los esfuerzos, costes, así como los riesgos para el operador. Posteriormente, estos compuestos serán separados y determinados mediante cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masa en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS).

Para lograr tales objetivos se ha procedido a:

- Desarrollar un método de extracción adecuado que posibilite la determinación simultánea de todos los colorantes objeto de estudio en gamba.
- Determinar los colorantes mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
- Validar el método optimizado.
- Utilizar el método de análisis desarrollado en el análisis de muestras reales.

2.2. Planteamiento del problema y justificación

La mayor escasez de determinadas especies marinas en nuestros mares y océanos ha llevado a la necesidad de abordar la acuicultura como una nueva forma de abastecimiento de algunos productos del mar (como salmón, trucha y gamba, entre otras especies). Sin embargo, el desarrollo de este tipo de industria afronta diversas dificultades, como por ejemplo la aparición de enfermedades infecciosas, lo cual en ocasiones es solventado a través de la utilización de colorantes con acción antimicrobiana como el verde de malaquita, el verde de leucomalaquita, el cristal violeta o el verde brillante.

La presencia de colorantes en productos del mar supone un problema debido a que muchos de ellos pueden afectar a la salud humana, tal y como demuestran algunos estudios realizados. Con el fin de intentar impedir su inadecuada utilización, la mayor parte de países del mundo han desarrollado una normativa al respecto.

La cada vez mayor concienciación por parte de la población del peligro real que entraña la ingesta de estos colorantes justifica la realización del presente estudio a través del cual se establece una metodología analítica sensible y fiable, que permite garantizar unos resultados adecuados, y en definitiva, evaluar la presencia o ausencia de los colorantes seleccionados en productos del mar.

2.3. Introducción

2.3.1. Acuicultura y colorantes

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha señalado que se ha producido en los últimos años un gran crecimiento del consumo de pescado por parte de la población. Así, se ha alcanzado un récord mundial de casi 17 kg de pescado por persona de media, suministrando a más de 3000 millones de personas al menos el 15 % de su ingesta media de proteínas de origen animal [1]. Este aumento ha sido posible gracias al desarrollo de la acuicultura, que ha permitido aumentar la producción, y según apunta el informe *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010 de la FAO* [2], se espera que este modo de producción proporcione en el futuro la mayor parte de los productos del mar consumidos. Además, la FAO alerta sobre la cada vez mayor escasez de pescado en los océanos a nivel mundial, informando de que cerca del 32 % de las reservas mundiales de pescado están sobreexplotadas, agotadas o en proceso de recuperación [2].

La *acuicultura* se define como “el arte de multiplicar y cultivar los animales y plantas acuáticas” [3]. Engloba todas las actividades que tienen por objeto la producción, crecimiento (desarrollo) y comercialización de organismos acuáticos, animales o vegetales, de aguas dulces, salobres o saladas [4]. El fin fundamental de las actividades acuícolas es la producción de materia viva en un medio acuático [4]. No obstante, dicha producción presenta una problemática referida a aspectos biológicos y técnicos consecuencia de la producción masiva de especies, así como problemas de índole ecológica (posible impacto de las instalaciones), social (posibles competencias con el sector pesquero tradicional) e incluso legal (utilización de espacios comunes como son costas y aguas) [5]. Asimismo, uno de los principales problemas a los que se enfrenta es la aparición de enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos.

Con el objetivo de reducir este tipo de enfermedades, se suelen adicionar compuestos antimicrobianos, generalmente en los piensos, originando un problema si no se administra al principio del brote, antes de que aparezca la pérdida del apetito. Como alternativa, se emplean baños de antibióticos cortos a concentraciones elevadas o baños largos a baja concentración [5]. En ocasiones, entre estos compuestos se emplean algunos colorantes debido a su bajo coste y alta efectividad. Así, la

la presencia de ciertos colorantes antimicrobianos en productos del mar (como las gambas) es una realidad, como demuestran las alertas emitidas por la Unión Europea (UE) al respecto en el año 2006 [6] o más recientemente en el año 2009 [7], como consecuencia de la detección del colorante verde de malaquita en pescado. De igual forma, el Instituto Nacional de Alimentación de Dinamarca ha realizado un estudio sobre la presencia de verde de malaquita y leucomalaquita en productos del mar comprendido entre el año 1988 hasta el 2005 [8]. Los datos obtenidos a partir de los estudios efectuados por este instituto muestran la existencia de análisis positivos en los últimos años, especialmente cuando las muestras procedían de países no pertenecientes a la UE, como es el caso de China, resultando escasos los análisis positivos cuando el pescado provenía de Dinamarca o Noruega. En el caso concreto de los análisis realizados a pescado procedente de China, los resultados mostraban que de un número total de 26 muestras tomadas en el año 2002, 19 de ellas eran positivas por la presencia de verde de malaquita y leucomalaquita en unas concentraciones que variaban de 1 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para el verde de malaquita y mayores de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en el caso del colorante leucomalaquita.

Además de la detección de colorantes como resultado de su utilización en baños para eliminar parásitos en acuicultura [9], se pueden encontrar en los productos del mar como consecuencia de hallarse en aguas contaminadas con vertidos industriales que los contengan [10], aunque acostumbra a ser menos frecuente.

▲ *Los colorantes*

Un colorante es un compuesto orgánico que contiene grupos cromóforos y auxóchromos unidos a un anillo de benceno [11]. Se definen como aquellas sustancias que dan color a un alimento o le devuelven su color original; pueden ser componentes naturales de los alimentos y de otras fuentes naturales que normalmente no se consumen, ni se emplean como ingredientes característicos de los alimentos [12].

Se pueden clasificar en dos grandes grupos: colorantes naturales y artificiales. A los colorantes naturales permitidos por el momento en alimentos pertenecen la β -carotina, el jugo de remolacha roja, los zumos de frutas, como por ejemplo, de cereza o naranja, y el pimentón, así como la clorofila [13]. Por otro lado, entre los colorantes sintéticos que se encuentran permitidos, destaca la utilización de amarillo de quinoleína o eritrosina cuando son absorbidos sobre hidróxido de aluminio, formando lo que se

conoce como una laca [14], o el empleo de verde de malaquita como medicamento veterinario en peces ornamentales [17].

Actualmente se procede a una amplia utilización de colorantes artificiales, siendo empleados en la industria textil, en las pinturas de las cerámicas, como bactericidas, en productos cosméticos, así como aditivos en el caso de algunos alimentos [15].

Concretamente en este trabajo se va a efectuar el estudio de cuatro colorantes: verde de malaquita, verde de leucomalaquita, cristal violeta y verde brillante. Todos ellos son colorantes que en ocasiones, como se ha mencionado anteriormente, son empleados de forma irregular en acuicultura, pudiendo causar graves trastornos en la salud, describiéndose a continuación las principales características de dichos compuestos.

✓ *Verde de malaquita:*

El verde de malaquita ($C_{23}H_{25}ClN_2$, Pm 369.91 g mol⁻¹), también denominado verde de la anilina o verde básico entre otros nombres, es un sólido de color verde oscuro. Está disponible en varias formas, principalmente como sal de oxalato o cloruro [16]. Se trata de un compuesto soluble en metanol y muy soluble en agua

(110 g L⁻¹ a 24 °C) [8]. En solución, este colorante existe como mezcla de su forma catiónica y su base, carbinol, con una proporción que varía en función del pH. Su constante de ionización (expresado como p*K*_a) es de 6.90. Por consiguiente, a pH ácido se encontrará favorecida su forma catiónica mientras que a pH básico predominará su forma carbinol [8]. Además, puede aparecer en su forma reducida, el verde de leucomalaquita. Ésta se produce en condiciones anaerobias por una gran cantidad de bacterias que se encuentran presentes en la microflora intestinal [17].

Entre sus aplicaciones se puede destacar que el verde de malaquita es un colorante que inicialmente se utilizó en la industria textil y del papel o como aditivo en alimentos [16]. Si bien, sus aplicaciones más relevantes están relacionadas con su

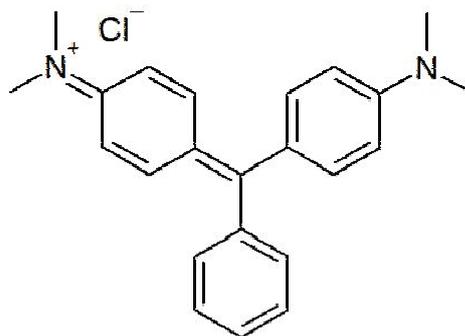


Figura 1. Estructura del verde de malaquita

capacidad para eliminar bacterias, protozoos (como *Ichthyophthirius* en *Ictarulus punctatus* [18]), cestodos, trematodos o nematodos [19]. Además, es un excelente fungicida [20] muy utilizado en la industria de la acuicultura y pesca durante mucho tiempo. Asimismo, se ha empleado contra la infección causada por helmintos como *Dactylogyrus vastator* en *Cyprinus carpio* [21].

Como consecuencia de todas sus propiedades, actualmente en algunos países está registrado como medicamento veterinario para peces ornamentales [17], encontrándose prohibida su utilización en piscifactoría [17].

Se disponen de estudios sobre la toxicidad del verde de malaquita que demuestran que se encuentra influenciada por la dureza del agua, pH, temperatura y la cantidad de oxígeno disuelto. Dichos estudios han indicado que la toxicidad de este compuesto se incrementa cuando aumenta la temperatura o disminuye el pH [16]. Entre los efectos que presenta, destaca que puede causar tumores hepáticos y renales en roedores [22], así como anomalías en el sistema reproductivo [17].

✓ *Verde de leucomalaquita:*

Como se ha mencionado anteriormente, el verde de leucomalaquita ($C_{23}H_{26}N_2$, Pm $330.47 \text{ g mol}^{-1}$) es un metabolito producido a partir del verde de malaquita. Se trata de un polvo de color blanco, que es ligeramente soluble en agua. Este compuesto tiene una vida media bastante superior a la del compuesto del que procede, siendo aproximadamente unos 40 días [23,24].

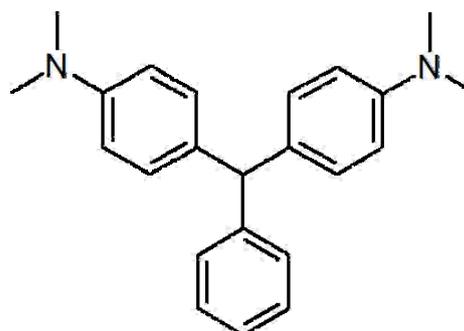


Figura 2. Estructura del verde de leucomalaquita

Este compuesto puede considerarse como potencialmente tóxico, además de poseer un alto potencial cancerígeno [25]. Diversos experimentos en ratones han demostrado que el verde de leucomalaquita aumenta la incidencia de aparición de tumores en el tiroides, como consecuencia de la inhibición de la peroxidasa tiroidea [26]. Además, se han efectuado numerosos estudios sobre sus posibles propiedades genotóxicas. Según éstos, el verde de leucomalaquita es capaz de unirse covalentemente

al ácido desoxirribonucleico (ADN), originando mutaciones en los genes del hígado [26].

✓ *Cristal violeta:*

El cristal violeta, también denominado como violeta básico 3, violeta degenciana, metil violeta 10B o cloruro de hexametil pararosanilina ($C_{25}H_{30}ClN_3$, Pm 407.98 g mol⁻¹), es un polvo de color violeta. Se trata de un colorante que puede ser absorbido por los tejidos de los peces, siendo reducido a un metabolito denominado leucocristal violeta [28].

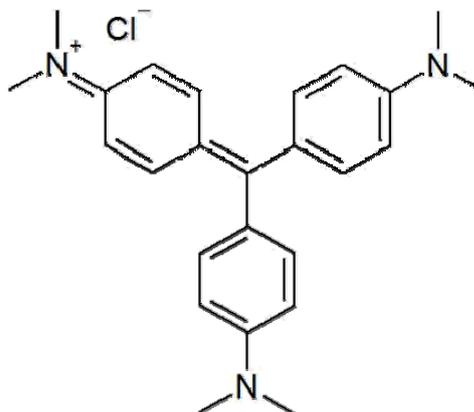


Figura 3. Estructura del cristal violeta

Este colorante ha tenido una importante aplicación en la medicina, como antiséptico de uso externo, o como agente antihelmíntico suministrado por vía oral. Más recientemente, se ha empleado para prevenir la enfermedad de Chagas [27], aunque, por lo general se está utilizando como colorante en tintas industriales o como microbicida [28]. Asimismo, se ha empleado como aditivo en piensos para inhibir el crecimiento de moho y hongos en la alimentación de aves [24].

No existen efectos agudos adversos tras su administración a corto plazo. Sin embargo, el cristal violeta presenta carácter mutagénico y existen estudios en ratones que demuestran que puede causar cáncer, siendo capaz de inducir tumores en el tiroides y en el hígado [29].

✓ *Verde brillante:*

El verde brillante ($C_{27}H_{34}N_2O_4S$, Pm 482.63 g mol⁻¹), también denominado comúnmente como verde esmeralda o verde básico 1, es un polvo cristalino de color verde oscuro.

Su solución no es resistente a la luz [30]. Cuando en solución acuosa se

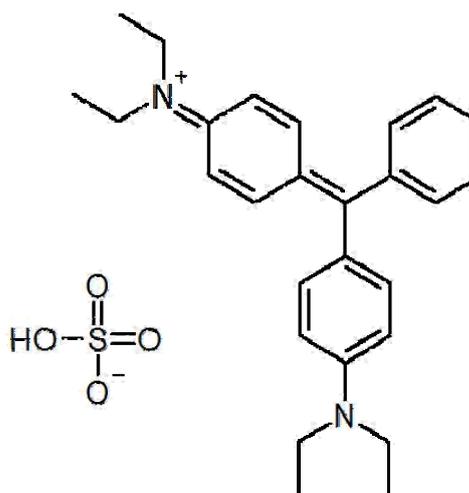


Figura 4. Estructura del verde brillante

encuentra a valores de pH por encima de 2.6 predomina en su forma básica [31].

Entre sus principales aplicaciones destaca su utilización en piscifactorías gracias a sus propiedades antimicrobianas y antiparasitarias, así como por su alta efectividad en la prevención y el tratamiento de determinadas enfermedades en peces con un bajo coste [32].

Como posibles efectos adversos destaca que causa graves quemaduras en los ojos. Asimismo, su ingestión produce irritación en el tracto gastrointestinal originando náuseas, vómitos y diarreas. En caso de inhalación puede resultar nocivo y en contacto con la piel causa irritación [33]. En cuanto a sus posibles propiedades cancerígenas, se puede decir que no se identifica ningún componente que tenga niveles mayores que o igual a 0.1 % como agente carcinógeno humano probable, posible o confirmado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Carcinógenos (IARC).

2.3.2. Legislación

En los últimos años, ha surgido una creciente preocupación por la seguridad y calidad de todos aquellos productos que nos rodean, especialmente en la alimentación. Esto ha llevado a revisar las formulaciones de los productos, estudiar con mayor exhaustividad su efecto sobre la salud e incluso en algunos casos a reducir el uso de colorantes artificiales.

De forma general, los productos del mar se encuentran sometidos a fuertes controles destinados a garantizar la seguridad de los consumidores, y suelen incluir los siguientes aspectos [34]:

- Un control periódico sobre las condiciones de higiene del desembarque y de la primera venta.
- Inspecciones periódicas de los buques y los establecimientos en tierra firme, con inclusión en las subastas de pescado y los mercados mayoristas, y de este modo comprobar la manipulación, la limpieza, los requisitos de higiene y temperatura.
- Controles sobre las condiciones de almacenamiento y de transporte.

Los controles oficiales de los productos del mar deben recoger los siguientes elementos: exámenes organolépticos, indicadores de frescura, detección de histamina, control de residuos y contaminantes, pruebas microbiológicas y de parásitos [34].

En las legislaciones establecidas sobre la temática de colorantes se suelen definir términos como aditivo, coloración, contaminante, límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL), entre otros, que ayudan a comprender el correcto significado que se pretende con dicha legislación.

La aparición de restos de colorantes en algunos productos procedentes de piscifactorías, hace imprescindible la existencia de una legislación que recoja los límites fijados para estos residuos y contaminantes en función del tipo de productos. Dicha reglamentación no aparece del todo definida, existiendo únicamente límites sobre la sensibilidad de los métodos utilizados para la determinación de algunos colorantes como el verde de malaquita y el verde de leucomalaquita.

Los organismos encargados de la elaboración de una legislación para controlar el uso de los colorantes, son principalmente la UE y la Agencia de Alimentos y Medicamentos Americana (*Food and Drug Administration*, FDA). La FDA prohibió en 1991 la utilización de verde de malaquita en acuicultura, como consecuencia de sus propiedades cancerígenas, y estableció una sensibilidad mínima para la determinación de residuos de verde de malaquita, verde de leucomalaquita y cristal violeta de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ [35].

En el caso de la UE, la legislación más relevante emitida para los colorantes en alimentos es la siguiente:

- **Decisión de la Comisión de 22 de diciembre de 2003 (2004/25/CE)**, por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de MRPLs para la determinación de residuos en alimentos de origen animal. En esta decisión, queda fijado el MRPL para la suma del colorante verde de malaquita y su metabolito la leucomalaquita en $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ en productos procedentes de la acuicultura [36].
- **Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004**, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano [34].

2.3.3. Determinación de colorantes en productos del mar

El desarrollo de técnicas analíticas cada vez más avanzadas ha permitido determinar la presencia de algunos colorantes utilizados ilegalmente que se hallaban a concentraciones muy bajas en algunos productos del mar. Los estudios desarrollados sobre estos colorantes comprenden diversas matrices, siendo investigada su presencia sobre todo en especies como salmón [37-39], bagre [40,41], trucha [40,41], anguila [42], carpa [42-44], camarones o marisco [42-44].

De forma general, el análisis de colorantes en gambas está compuesto principalmente por dos etapas:

- El proceso de extracción de los colorantes de la matriz.
- La determinación analítica.

2.3.3.1. Proceso de extracción

En la literatura publicada y consultada, uno de los procedimientos de extracción más empleados ha sido la extracción sólido-líquido (SLE). Este procedimiento de extracción se basa en la puesta en contacto de una determinada cantidad de muestra, pudiendo variar de 2 g [38,40] a 5 g [39,43] con un disolvente adecuado [45]. Entre las disoluciones extractantes, se han utilizado ampliamente disoluciones de clorhidrato de hidroxilamina, ácido p-toluensulfónico, tampón de acetato amónico (pH 4.5) y acetonitrilo [29,41,46]. Asimismo, en otros muchos casos, se ha optado por utilizar un tampón McIlvaine de pH 3 y acetonitrilo [35,38,40]. Entre los inconvenientes que presenta esta técnica podemos destacar que simultáneamente a la extracción de analitos se pueden co-extraer especies interferentes que podrían dificultar la determinación final de los colorantes objeto de estudio [45].

Posteriormente, la mezcla es sometida a distintos procesos más o menos agresivos, como una extracción líquido-líquido (LLE) con diclorometano [47,48], o la adición de sales como NaCl [35] o alúmina neutra [43]. En algunos casos tras la adición de alúmina se realiza una LLE con diclorometano [42,43,49]. Además, cabe mencionar que en algunas investigaciones se ha omitido dicha etapa [35], ya que de este modo se consigue una menor manipulación de la muestra, reduciendo el tiempo de extracción y viéndose disminuido el riesgo para la salud al evitar el uso de disolventes tóxicos.

Tras estas primeras etapas de la extracción, suele ser necesario proceder a la purificación de los extractos, siendo lo más habitual emplear una extracción en fase sólida (SPE) [38,42,47,49]. Entre los sorbentes más utilizados en la literatura consultada hay que resaltar los sorbentes de modo mixto de intercambio iónico (OASIS MCX) [35,42,50], los de intercambio catiónico (SCX) [38,47,51] y los de alúmina [41,43]. Recientemente están apareciendo publicaciones en las que se desarrollan nuevos sorbentes mucho más selectivos para llevar a cabo dicho proceso de purificación, como por ejemplo, sorbentes basados en polímeros de impresión molecular (MIPs) [39,44,52] o nanopartículas de magnetita [53] (en el caso de analizar muestras de agua).

Por otro lado, con objeto de simplificar esta etapa de extracción y buscando una alternativa a las técnicas de extracción convencionales empleadas para la determinación de los colorantes, en la presente investigación se decidió evaluar la utilización del método QuEChERS (acrónimo de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro) [54,55], el cual posee numerosas ventajas en relación a las extracciones tradicionales. Dicho método se basa en una extracción con acetonitrilo acidificado, seguido de una partición inducida con sales y posterior limpieza con PSA (amina primaria-secundaria) [54]. Generalmente, esta metodología de extracción se ha empleado para compuestos en una amplia gama de polaridades, tales como plaguicidas [56-58], micotoxinas [59,60] o drogas veterinarias [61-63], siendo utilizada en esta ocasión por primera vez para la extracción de colorantes en gambas.

2.3.3.2. Determinación analítica

La mayor parte de métodos empleados para la determinación de colorantes en productos del mar se basan en la utilización de cromatografía de líquidos (LC) acoplada a diferentes tipos de detectores, encontrándose entre los más habituales el detector de diodos en fila (DAD) [35,51] y el detector de ultravioleta-visible (UV-visible) [41,49,64]. Asimismo, se pueden producir acoplamientos entre diferentes detectores, como el acoplamiento entre el detector de UV-visible y el de fluorescencia (FLD) [47], siendo el detector UV-visible el utilizado para determinar el colorante verde de malaquita ($\lambda = 620 \text{ nm}$), mientras que el de FLD se emplea para el verde de leucomalaquita ($\lambda_{\text{ex}} = 265 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$). Generalmente, las determinaciones llevadas a cabo mediante los sistemas de detección mencionados suelen ir acompañadas

de una segunda determinación por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para llevar a cabo el proceso de confirmación de los compuestos [35,65,66].

➤ **Análisis cromatográfico**

En el análisis de colorantes en productos del mar mediante LC, son diversos los aspectos instrumentales y operatorios a ser considerados, entre los que se pueden mencionar: tipo y longitud de columna, fase móvil, flujo de fase móvil, volumen de muestra a ser inyectada y condiciones de detección.

En relación a las columnas empleadas mayoritariamente en los sistemas de LC con detectores de FLD o MS se puede indicar que se trabaja con columnas cuyo relleno es apolar, empleando fases estacionarias tipo C₁₈ [38,40] o C₈ [43,39].

En cuanto a las fases móviles, se puede destacar la utilización de mezclas binarias como acetato amónico/acetoneitrilo [29,40,70], tampón fosfato/acetoneitrilo [43], acetato sódico/acetoneitrilo [71] o ácido fórmico al 0.1 % (v/v) /acetoneitrilo [37,39].

Por otro lado, los volúmenes de inyección son un parámetro que varía significativamente en función de la bibliografía consultada, oscilando entre 10 µL [37,72,73] y 100 µL [35,64,74]. Asimismo, se debe destacar que en cierta bibliografía se efectúan reacciones de derivatización pre-columna [39,41,49] o post-columna [40,75,76] con el fin de transformar el verde de malaquita en su metabolito, el verde de leucomalaquita. Entre los agentes derivatizantes más empleados para la reacción de oxidación pre-columna se encuentra una solución de yodo [43] y el reactivo 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) [39,41]. En relación a la derivatización post-columna, el reactivo más utilizado es el óxido de plomo (IV) (PbO₂) [40,75]. Este tipo de reacciones de derivatización se emplean tanto con detectores de UV-visible [41,49] o FLD, como con MS [39,40].

Un aspecto que resulta de gran importancia y que varía mucho en función de la metodología empleada es el tiempo de análisis, pudiendo distinguirse dos grandes grupos: aquellos métodos en los que los tiempos de análisis se encuentran comprendidos entre los 20 y los 30 minutos [44,69], y los métodos cuyo tiempo total de análisis es inferior a 10 min [70]. Este parámetro se halla directamente relacionado con el tamaño de partícula de la fase estacionaria empleada, de modo que cuanto menor sea el tamaño de partícula, menor será el tiempo total de análisis y mayor será la resolución

cromatográfica alcanzada. Por consiguiente, cada vez más se están utilizando columnas con un tamaño de partícula inferior a 5 ó 3 μm . En este sentido, cuando el diámetro de partícula es inferior a 2 μm se habla de cromatografía de líquidos de ultra presión (UHPLC) [77], técnica desarrollada en los últimos años y que permite además de una mejor resolución, una mayor velocidad lineal de flujo y sensibilidad. Su principal inconveniente se debe a que las presiones de trabajo son muy altas (10000-15000 psi), siendo necesaria la utilización de instrumentos diseñados especialmente para ello [78].

Finalmente, también cabe destacar que la mayoría de los métodos analíticos que se emplean para la determinación de colorantes se basan en la determinación simultánea de verde de malaquita y verde de leucomalaquita [47,71,79]. En otros casos, se determinan los dos compuestos mencionados anteriormente junto con el cristal violeta [35,42,44], resultando bastante inferior el número de publicaciones que determinan simultáneamente verde de malaquita, verde de leucomalaquita, cristal violeta y verde brillante [39,69]. Dichas metodologías, a diferencia de la desarrollada en el presente estudio, poseen tiempos de análisis relativamente largos [69], efectúan tediosos procedimientos de extracción [39] o precisan de una reacción de derivatización previa de los compuestos [39].

➤ ***Espectrometría de masas (MS)***

La espectrometría de masas (MS) es una técnica utilizada para la identificación y cuantificación de compuestos, y para elucidar la estructura química de algunas moléculas, en función de la relación *masa/carga* (m/z) de los iones [67].

La zona del instrumento donde se introduce la muestra, se evapora, y las moléculas de analito se ionizan y se aceleran, se denomina fuente de ionización. Los iones son separados en el analizador y llegan al detector, generando una corriente eléctrica que se amplifica en un multiplicador de electrones, produciendo una señal de salida que es recogida por un sistema de recogida de datos. Finalmente, se representa la intensidad de la corriente recibida frente a la relación m/z generándose el espectro de masas [67], como se muestra en la *Figura 5*.

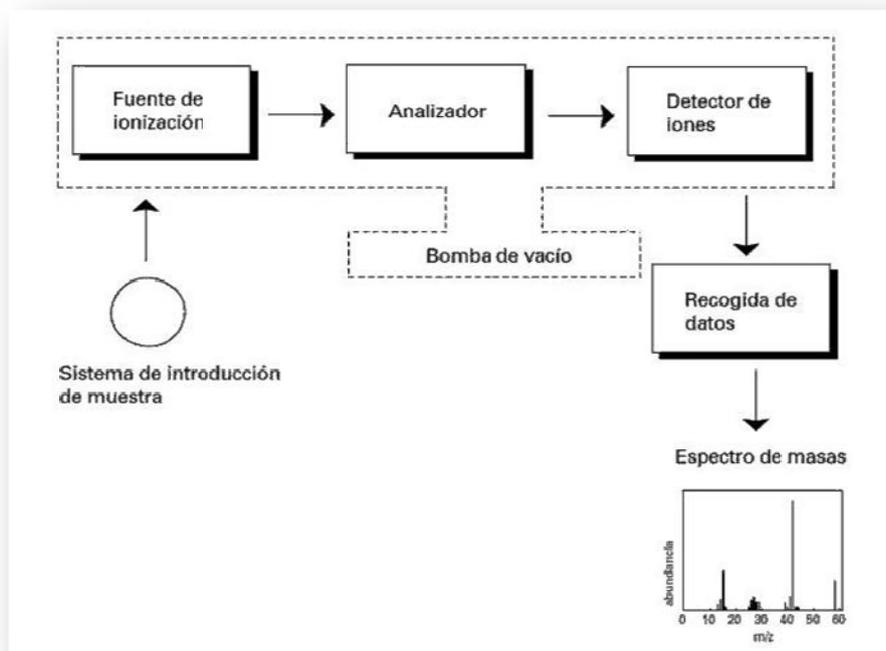


Figura 5. Estructura fundamental de un espectrómetro de masas

En MS existen distintos tipos de analizadores, los cuales pueden clasificarse en analizadores de baja resolución como el cuadrupolo simple (Q) o la trampa de iones (IT) o de media/alta resolución como tiempo de vuelo (TOF) o el Orbitrap. En el caso del análisis de colorantes, lo más habitual es emplear analizadores de triple cuadrupolo (QqQ) [35,50] o de IT [49,68], existiendo también algunos casos en los que se utilizan analizadores TOF [37], Orbitrap [69], o analizadores híbridos [39].

Además, la MS permite operar en tres modos de trabajo distintos: barrido completo o *full scan*, monitorización de iones seleccionados (SIM) y MS/MS, en función de las necesidades de los compuestos examinados. Por lo general, y para la detección de este tipo de compuestos, se suele emplear la MS/MS [38,42], siendo menor la utilización del modo barrido completo [29,65].

Finalmente y en relación al tipo de ionización, normalmente se emplea la ionización a presión atmosférica, siendo la modalidad de electronebulización o electrospray (ESI) [38,40,42], la más usada, existiendo poca bibliografía donde se utilice la ionización química a presión atmosférica (APCI) [29,65].

Por consiguiente, en este trabajo se pretende la determinación simultánea de los cuatro colorantes en gambas mediante UHPLC acoplada con QqQ (UHPLC-QqQ-MS/MS) a través de un procedimiento de extracción rápido y sin la necesidad de llevar a cabo un proceso de derivatización de los compuestos.

III. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y materiales

3.1.1. Reactivos

La sal de oxalato de verde de malaquita (pureza > 96 %), el verde de leucomalaquita (pureza > 98 %), el cristal violeta (pureza > 89%) y el verde brillante (pureza > 90 %) fueron adquiridos de la casa comercial Aldrich (Steinheim, Alemania). Las disoluciones patrón de cada compuesto se prepararon disolviendo una cantidad del compuesto correspondiente en metanol (excepto el verde brillante que fue preparado en acetonitrilo), con concentraciones que abarcan el intervalo comprendido entre 100 y 300 mg L⁻¹. Estas disoluciones se conservaron en frascos topacio a - 30 °C durante un máximo de seis meses.

Igualmente, se preparó una disolución intermedia de trabajo con todos los compuestos en metanol a una concentración de 2 mg L⁻¹, que se conservó en frasco topacio a -30 °C, preparándose nueva cada tres meses.

Otros reactivos como metanol, acetonitrilo y acetato de etilo (grado HPLC) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El ácido fórmico (pureza ≥ 98 %) y el formiato amónico (pureza ≥ 97 %) se adquirieron en Fluka (Seelze, Alemania), mientras que el ácido acético glacial (pureza > 99%) fue suministrado por Panreac (Barcelona, España). Las sales de sulfato magnésico anhidro (pureza > 97%), cloruro sódico (pureza > 99.5%), citrato trisódico (pureza > 99%), sulfato sódico anhidro (pureza > 99%) y acetato sódico anhidro (pureza > 99%) procedían de J.T. Baker (Deventer, Holanda), en tanto que el citrato disódico (pureza > 99%) se adquirió en Sigma-Aldrich. El agua ultrapura se obtuvo a partir de un sistema de gradiente de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.1.2. Materiales

Se emplearon filtros de 0.2 µm de Nylon de Millex-GN (Millipore, Carrigtowhill, Irlanda) para filtrar extractos diluidos en la fase móvil, así como tubos centrífuga de polipropileno con una capacidad de 50 mL para llevar a cabo el proceso de extracción.

3.2. Equipos

3.2.1. UHPLC-QqQ-MS/MS

Los análisis cromatográficos se efectuaron con un sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MS, USA), logrando la separación de los compuestos a través de una columna Kinetex C₁₈ (50 x 2.1 mm, 2.6 µm de tamaño de partícula) procedente de Phenomenex (Torrance, CA, EEUU). La detección de los compuestos se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas de QqQ Waters Acquity TQD (Waters, Manchester, Reino Unido). Se empleó una fuente de ionización de ESI en modo positivo.

Para adquirir los datos fue utilizado el software MassLynx 4.0 con el programa QuanLynx de Waters.

3.2.2. Otros equipos

Otros equipos usados para la realización de las diferentes experiencias han sido:

- Centrífuga de tipo Centronic BL II (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- Balanza analítica de tipo AB204 (Mettler, Toledo, Greinfesee, Suiza).
- Agitador rotatorio Reax 2, procedente de Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Homogenizador de muestras (Sammic S.L., Azoitia, España).
- Evaporador Syncore (Büchy, Suiza) utilizado para concentrar los extractos.

3.3. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se llevó a cabo a través de una fase móvil compuesta por metanol (como eluyente A) y una disolución acuosa de formiato amónico 10 mM (como eluyente B), a un flujo de 0.3 mL min⁻¹. La separación se efectuó en modalidad de gradiente, empleando las condiciones indicadas en la *Tabla 1*, obteniéndose finalmente un tiempo total de análisis de 5.5 min. La temperatura de la columna se fijó a 30 °C y el volumen de inyección a 5 µL.

Tabla 1. Gradiente de elución empleado para la separación de los colorantes

Tiempo (min)	0.0	2.0	4.0	4.5	5.5
Eluyente A (%)	10	100	100	10	10

3.4. Determinación mediante MS/MS

La determinación por MS/MS requiere el establecimiento de los siguientes parámetros:

- Voltaje del capilar: 3.5 kV.
- Voltaje del extractor: 2 V.
- Temperatura de la fuente: 120 °C.
- Temperatura de desolvatación: 350 °C.
- Flujo del gas de cono (nitrógeno): 80 L h⁻¹.
- Flujo del gas de desolvatación (nitrógeno): 600 L h⁻¹.

La disociación inducida por colisión (*Collision-induced dissociation*, CID) se efectuó con argón a una presión de $4 \cdot 10^{-3}$ mbar en la celda de colisión.

3.5. Procedimiento de extracción

Con el objetivo de extraer los colorantes de las gambas, se procedió a la evaluación de distintos procedimientos de extracción basados en el método QuEChERS, seleccionándose finalmente el procedimiento descrito a continuación.

✓ Método propuesto

Pesar 5 g de gamba homogeneizada en un tubo de centrifuga de 50 mL, añadir 5 mL de agua Milli-Q y 10 mL de acetonitrilo acidificado con ácido fórmico al 1% (v/v). A continuación, agitar durante 1 h en un agitador rotatorio. Seguidamente, añadir 4 g de sulfato sódico anhidro y 1 g de acetato sódico anhidro, y agitar durante 1 min. A continuación, centrifugar a 5000 rpm (4136 g) durante 5 min. Finalmente, tomar 1 mL de sobrenadante para ser inyectado en el sistema UHPLC-QqQ-MS/MS (*Figura 6*).

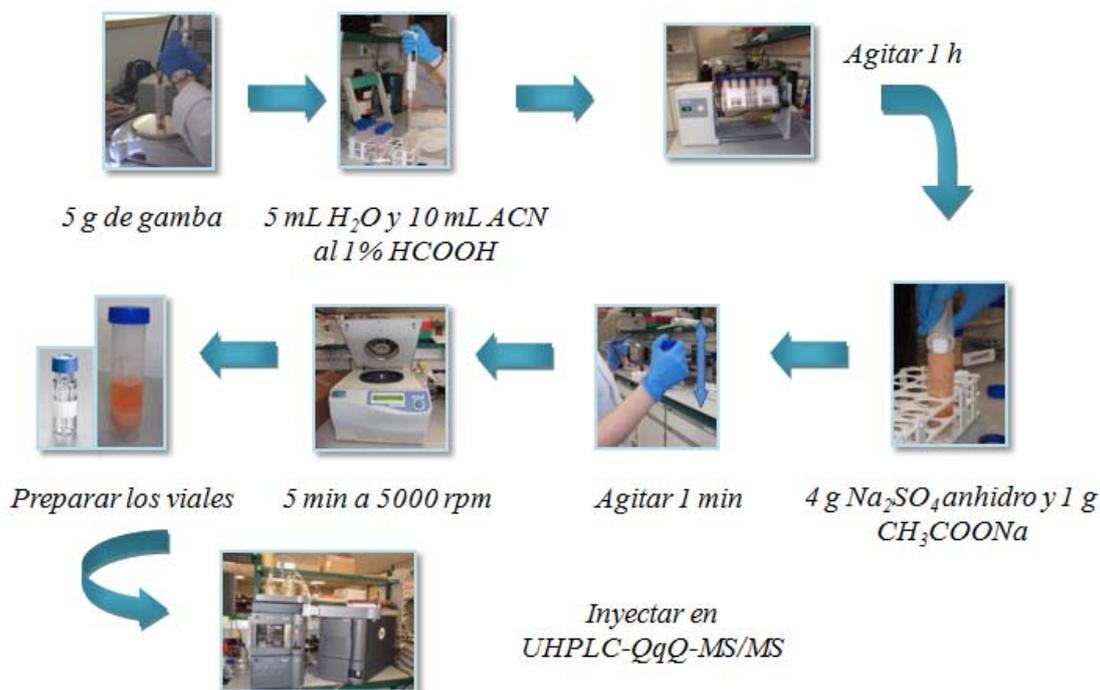


Figura 6. Esquema general del procedimiento de extracción

3.6. Muestras empleadas

Para efectuar la presente investigación se adquirieron gambas frescas procedentes de distintos comercios de la provincia de Almería. Previo a su análisis se procedió a su homogenización y posterior conservación a $-30^{\circ}C$ en bolsas de plástico cerradas herméticamente con una capacidad de aproximadamente unos 100 g. Aquellas muestras de gambas que carecían de los compuestos investigados se emplearon para optimizar el procedimiento de extracción y realizar los estudios de validación. Una vez optimizado el método, se evaluaron diez muestras distintas de gamba obtenidas en diversos centros comerciales de la provincia de Almería.

3.7. Procedimiento de validación

Este método se validó para la determinación de los compuestos seleccionados en gambas en términos de linealidad, veracidad, repetibilidad, precisión intermedia, límites de detección, límites de cuantificación y selectividad.

La linealidad del método se evaluó mediante el uso de calibrados en matriz, para lo cual se prepararon patrones en extracto blanco de gamba a ocho concentraciones distintas comprendidas entre 1-250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

La linealidad se estimó a través de los valores obtenidos de coeficiente de determinación (R^2). La repetibilidad, así como las recuperaciones se evaluaron a cuatro niveles de concentración distintas (2, 10, 25 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y empleando tres réplicas para cada nivel de concentración. La precisión intermedia se analizó a los cuatro niveles de concentración mencionados anteriormente durante cinco días. Los límites de detección y de cuantificación se calcularon a través del análisis de blancos fortificados a cuatro concentraciones, 0.1, 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$. De este modo, se estableció el límite de detección como la concentración más baja de analito que posee una relación señal/ruido igual a 3 y el límite de cuantificación como aquella concentración más baja de analito que proporciona una relación señal/ruido de 10.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del análisis a través de UHPLC-MS/MS

Con el fin de optimizar los diferentes parámetros de MS, fue necesario profundir cada uno de los colorantes a una concentración de 25 mg kg⁻¹, y de este modo determinar sus iones característicos en sus condiciones óptimas. Todos ellos se examinaron mediante ESI en modo positivo.

En primer lugar, se obtuvieron los espectros MS de cada uno de los compuestos a distintos voltajes de cono, y se seleccionó un ion precursor a aquel voltaje de cono que proporcionaba mayor intensidad. El ion precursor escogido para los cuatro compuestos seleccionados ha sido el $[M + H]^+$. Posteriormente, dicho ion precursor, a su correspondiente voltaje de cono óptimo, se sometió a su ruptura mediante distintas energías de colisión, originándose sus correspondientes iones producto, seleccionando los tres iones más característicos de cada compuesto a la energía de colisión óptima que proporcionaba una mayor intensidad para cada ion producto.

Entre los tres iones producto seleccionados, se escogió la transición más sensible para la cuantificación y las otras dos menos sensibles para llevar a cabo la confirmación. En la *Tabla 2* se muestran las transiciones MS/MS, indicándose en cada caso cuales han sido las seleccionadas para efectuar la cuantificación y la confirmación, además de indicar los valores de voltaje de cono y energía de colisión óptimos para cada uno de los compuestos evaluados. En las *Figuras 7, 8, 9 y 10* se muestran los espectros obtenidos para cada compuesto en sus correspondientes condiciones óptimas.

Las condiciones óptimas de trabajo para cada uno de los parámetros utilizados para la determinación MS/MS, como son el voltaje del capilar, el flujo de gas de desolvatación, la temperatura de la fuente o de desolvatación, entre otros, son las que aparecen indicados en el apartado 4 de la sección *Experimental*.

Tabla 2. Parámetros MS/MS de los colorantes seleccionados

<i>Compuesto</i>	<i>Ion precursor (m/z)</i>	<i>Voltaje de cono (V)</i>	<i>Iones productos (m/z)</i>	<i>Energía de colisión (eV)</i>
<i>Verde de malaquita</i>		40	165.1	60
	329.2	40	208.2	45
		40	313.3^a	35
<i>Cristal violeta</i>		45	251.2	35
	372.2	45	328.3	40
		45	356.3^a	40
<i>Verde brillante</i>		65	241.2	70
	385.5	65	297.2	50
		65	341.3^a	40
<i>Verde de leucomalaquita</i>		45	239.3^a	35
	331.4	45	272.2	30
		45	316.3	20

^a Transición utilizada para cuantificar.

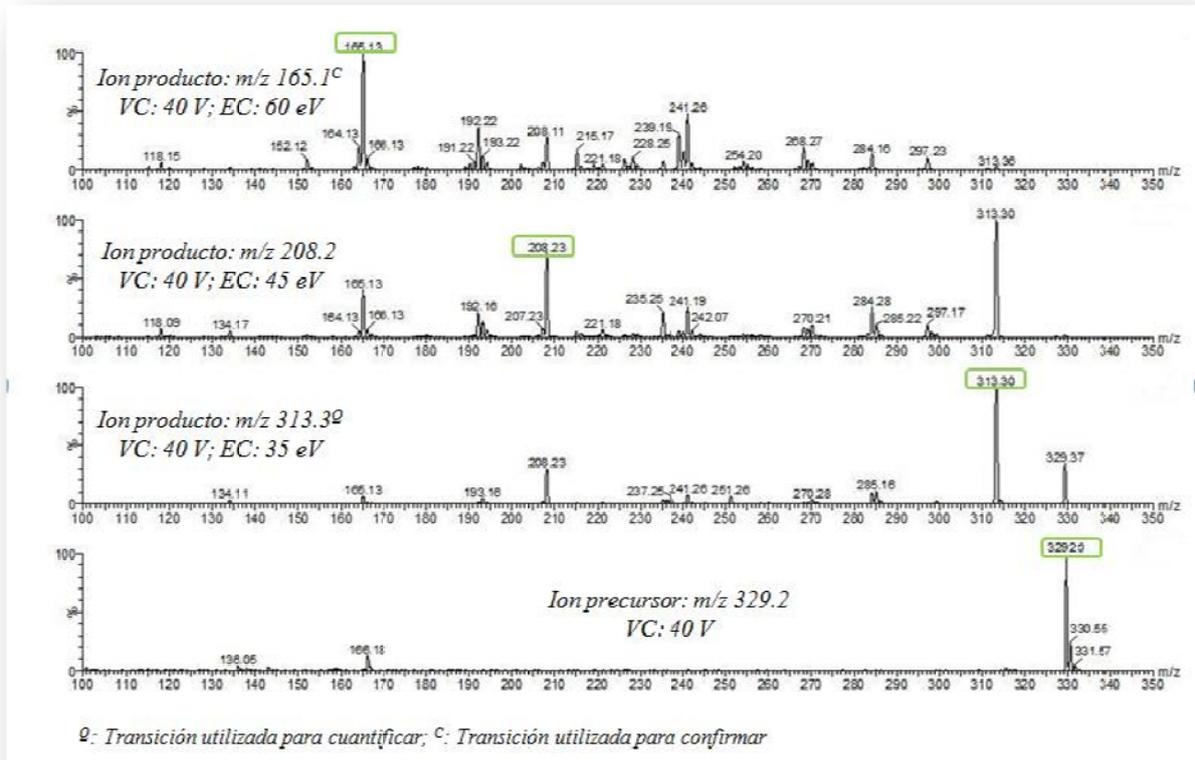


Figura 7. Espectros de masas obtenidos para el colorante verde de malaquita

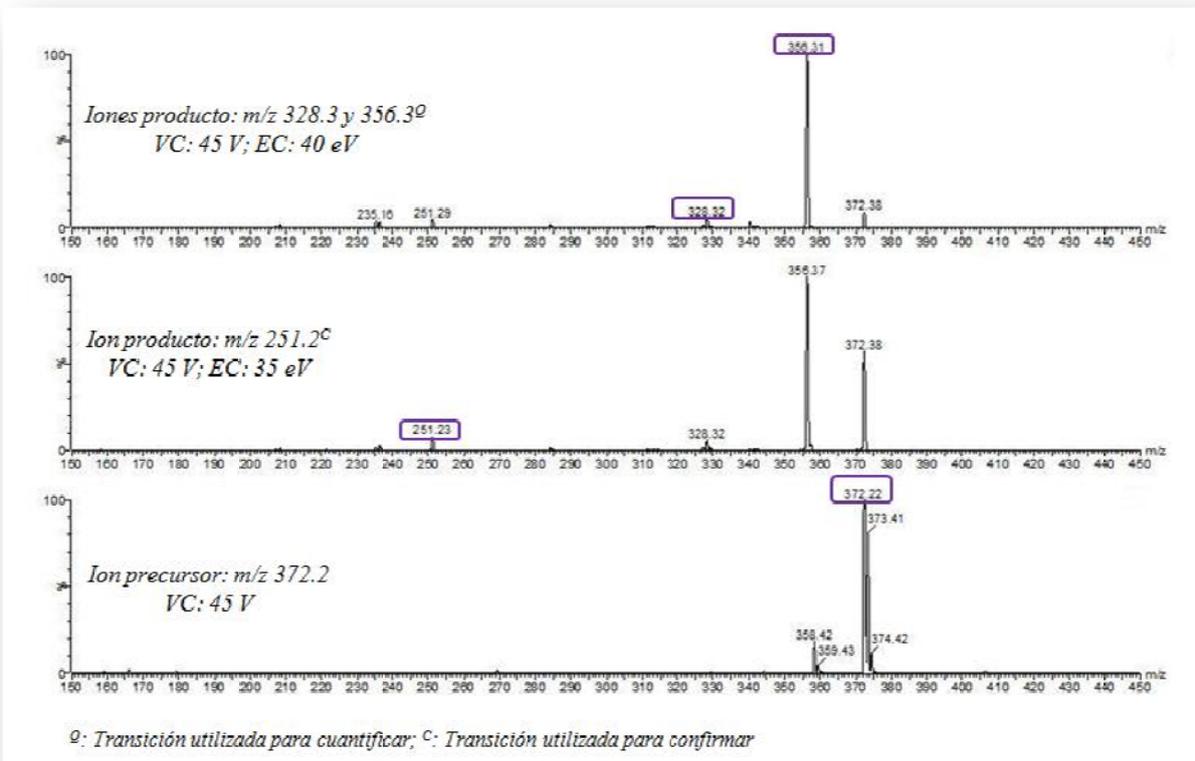


Figura 8. Espectros de masas obtenidos para el colorante cristal violeta

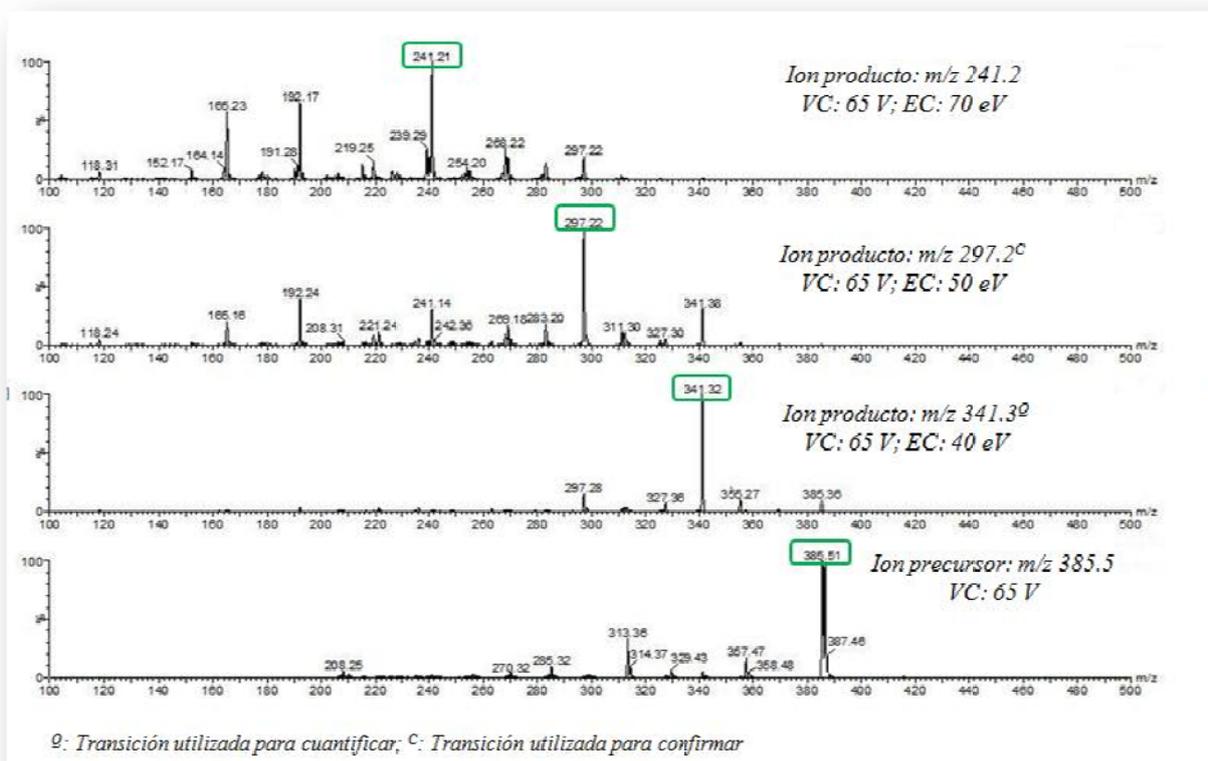


Figura 9. Espectros de masas obtenidos para el colorante verde brillante

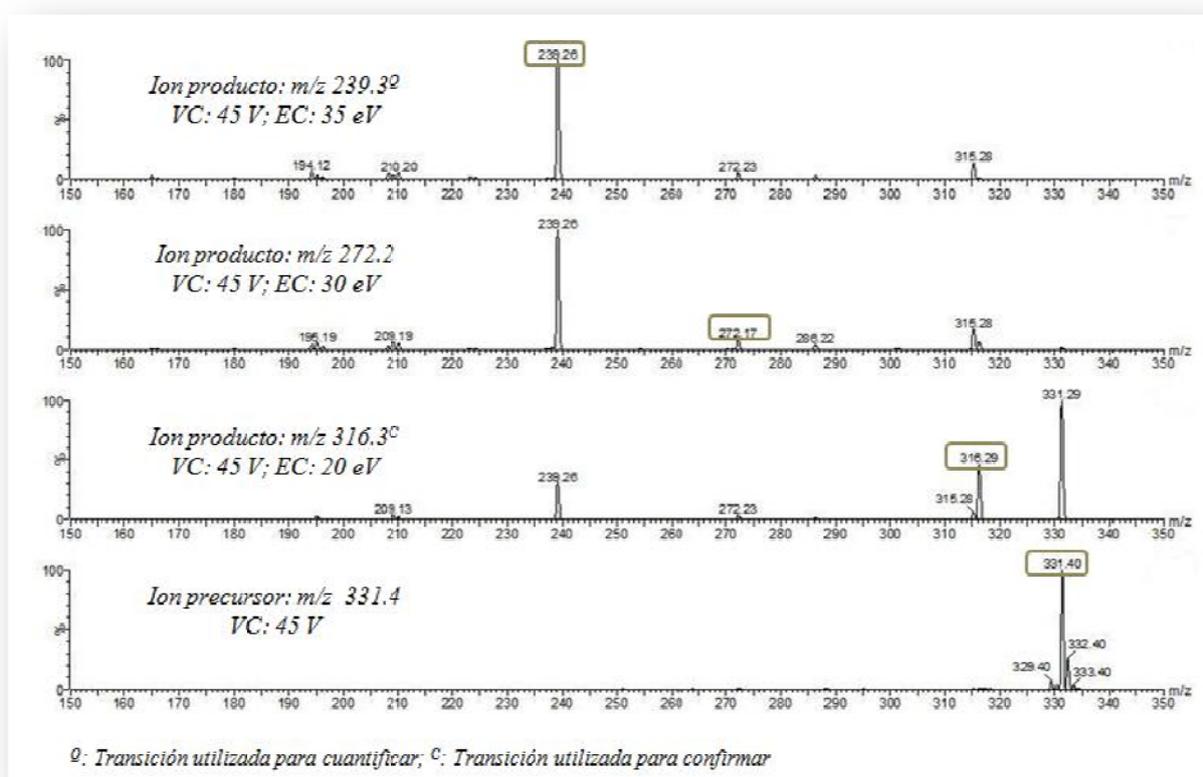


Figura 10. Espectros de masas obtenidos para el colorante verde de leucomalaquita

4.1.1. Optimización de la separación cromatográfica

Con el objetivo de optimizar la separación cromatográfica de todos los compuestos, se evaluaron diversas composiciones de fase móvil. Conviene indicar que todo este proceso de optimización se realizó con todos los compuestos (a una concentración de $500 \mu\text{g L}^{-1}$) excepto el verde brillante, debido a que la llegada del correspondiente patrón analítico se demoró más de lo previsto; no obstante, tras su obtención se comprobó que las condiciones óptimas establecidas eran igualmente adecuadas para el citado compuesto.

En primer lugar, se decidió probar como fase móvil una composición de metanol (eluyente A) y formiato amónico 5 mM (eluyente B), empleando un flujo de 0.3 mL min^{-1} , y una temperatura de la columna de $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Para esta primera experiencia se utilizó el gradiente que se muestra en la *Tabla 3*, con un tiempo de análisis cromatográfico total de 8 minutos.

Tabla 3. Gradiente de elución empleado para la separación de los colorantes

Tiempo (min)	0.0	1.0	2.0	7.0	8.0
Eluyente A (%)	10	50	90	90	10

Esta primera fase móvil no proporcionó buenos resultados, puesto que en el cromatograma que correspondía al compuesto verde de leucomalaquita se apreciaba un desdoblamiento del pico cromatográfico (véase *Figura 11*). Por este motivo, se planteó el estudio de otras fases móviles, así como la modificación de la concentración de formiato amónico.

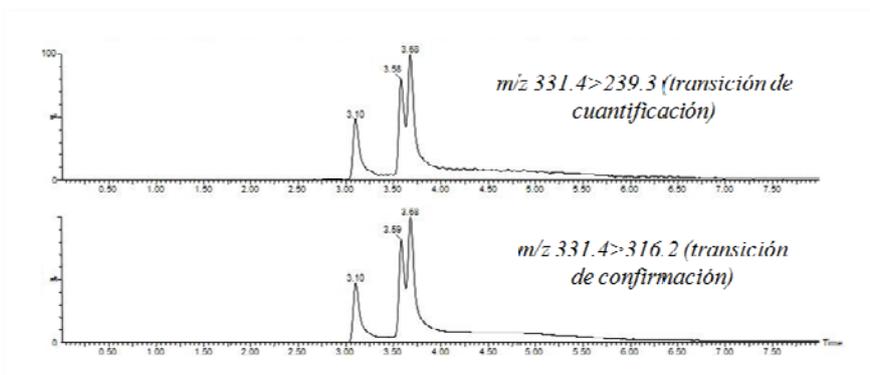


Figura 11. Cromatograma del compuesto verde de leucomalaquita utilizando como fase móvil metanol (eluyente A) y formiato amónico 5 mM (eluyente B)

Así, en segundo lugar, se procedió a evaluar como fase móvil metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido fórmico al 0.1 % (v/v) (eluyente B), con las mismas condiciones de flujo, temperatura de columna y gradiente descritas anteriormente. Los resultados obtenidos en este caso tampoco fueron adecuados, puesto que con esta fase móvil también existía el problema de que los picos de los compuestos estudiados se desdoblasesen, como se muestra en la *Figura 12*.

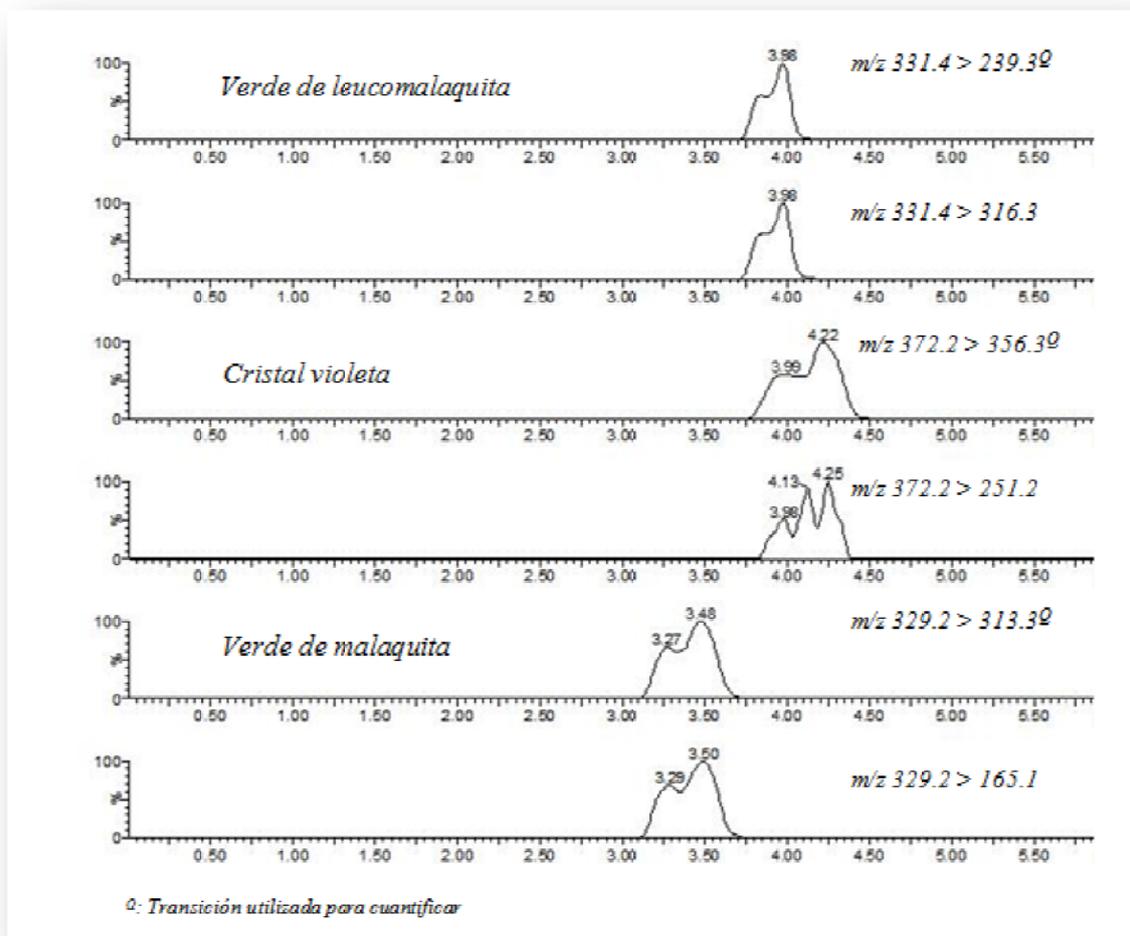


Figura 12. Cromatogramas obtenidos al utilizar como fase móvil MeOH (eluyente A) y ácido fórmico al 0.1% (v/v) (eluyente B)

En vista de los resultados obtenidos, se optó por evaluar distintas concentraciones de ácido fórmico (0.01 % y 0.05%, v/v), y una sola concentración de formiato amónico (10 mM) en las mismas condiciones expuestas anteriormente. Pese a que los resultados logrados con estas tres fases móviles eran muy similares, finalmente se decidió escoger como componente acuoso de la fase móvil, formiato amónico 10 mM, el cual ofrecía una mejor sensibilidad y menor tiempo de retención

(Figura 13, 14 y 15), sin desdoblamiento de picos de los compuestos objeto de estudio. Este hecho ponía de manifiesto la importancia de la selección de las características de la fase acuosa empleada.

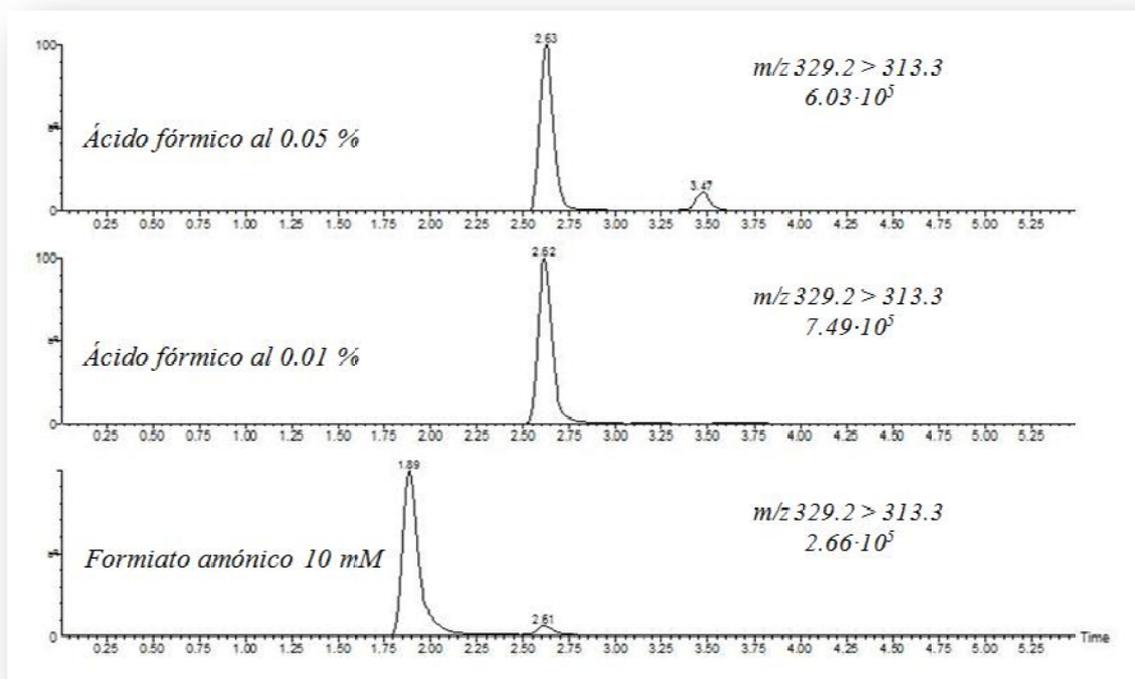


Figura 13. Cromatogramas obtenidos mediante el empleo de diferentes fases móviles para el verde de malaquita

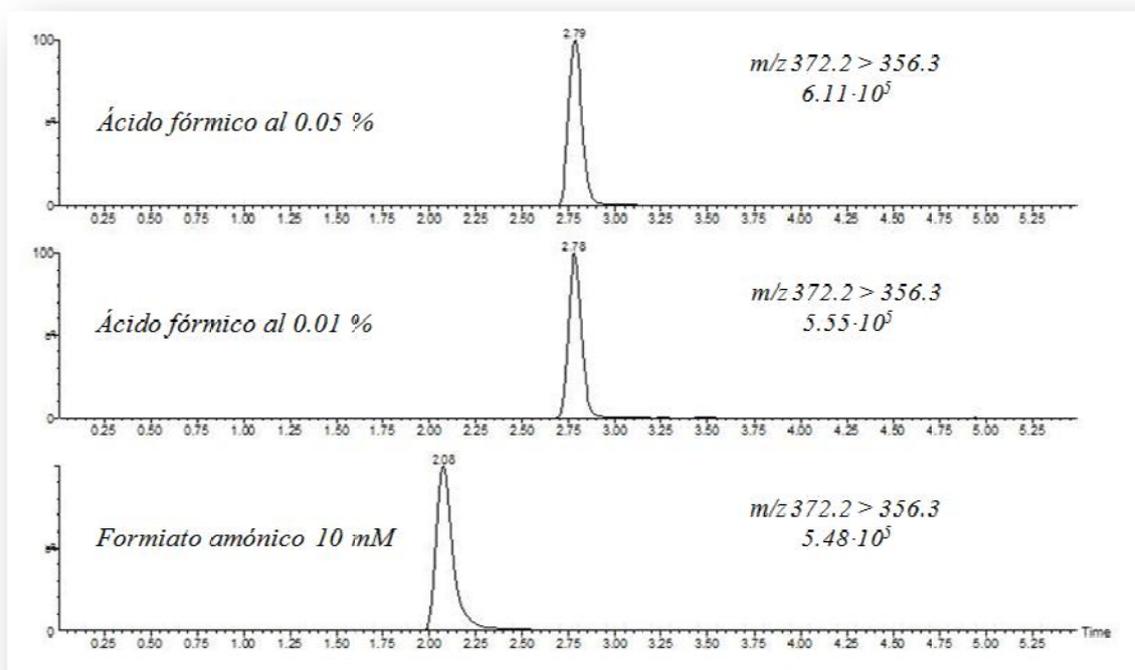


Figura 14. Cromatogramas obtenidos mediante el empleo de diferentes fases móviles para el cristal violeta

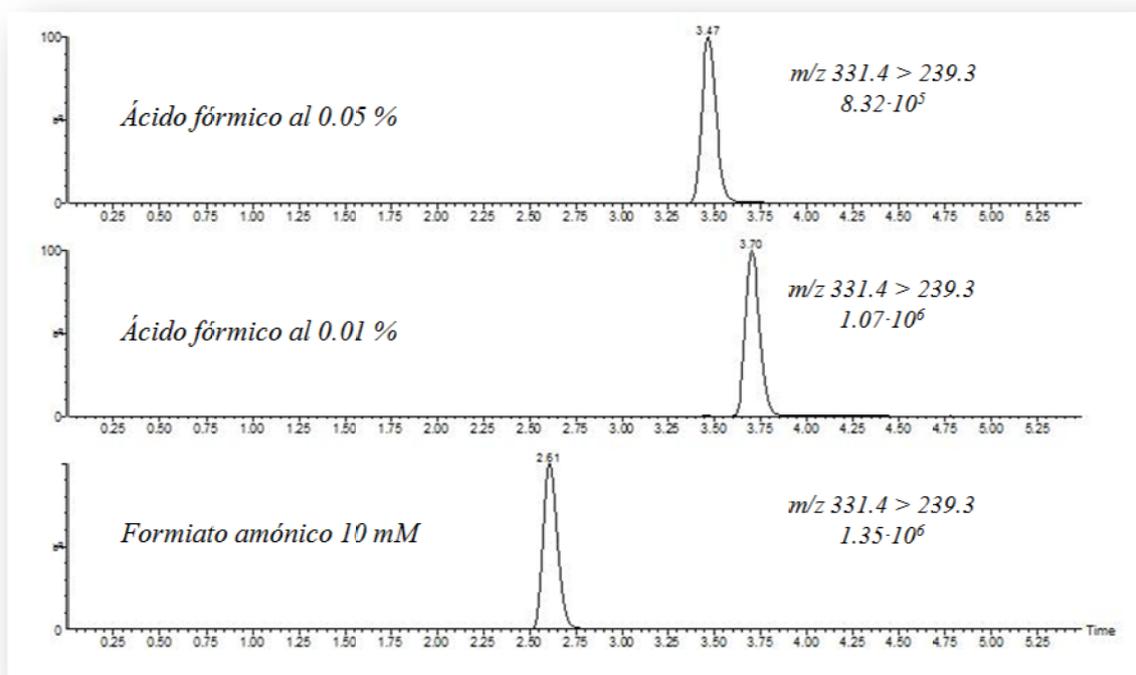


Figura 15. Cromatogramas obtenidos mediante el empleo de diferentes fases móviles para el verde de leucomalaquita

Una vez seleccionada la fase móvil que mejores resultados proporcionaba, se decidió optimizar el flujo de fase móvil, probando los flujos 0.2 mL min^{-1} , $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y 0.4 mL min^{-1} . A raíz de los resultados mostrados en la *Tabla 4*, se seleccionó finalmente el flujo de 0.3 mL min^{-1} como aquel que nos proporcionaba una mejor respuesta cromatográfica. Se debe indicar que los valores de las intensidades en las distintas transiciones que caracterizan a cada compuesto son más o menos similares en el caso de los flujos de 0.3 y 0.4 mL min^{-1} , por lo que finalmente se optó por operar a un flujo de 0.3 mL min^{-1} , lo cual supone un menor gasto de disolvente, así como un aumento de los tiempos de retención que puede ayudar a separarlos de la matriz, ya que sus tiempos de retención suelen ser relativamente pequeños.

Tabla 4. Efecto del flujo de fase móvil en el área de pico de los compuestos evaluados

Compuesto	Área de pico^a		
	<i>Flujo 0.2 mL min⁻¹</i>	<i>Flujo 0.3 mL min⁻¹</i>	<i>Flujo 0.4 mL min⁻¹</i>
<i>Verde de malaquita</i>	$8.386 \cdot 10^5$	$9.021 \cdot 10^5$	$8.831 \cdot 10^5$
<i>Cristal violeta</i>	$5.150 \cdot 10^5$	$6.834 \cdot 10^5$	$6.973 \cdot 10^5$
<i>Verde de leucomalaquita</i>	$9.199 \cdot 10^5$	$1.256 \cdot 10^6$	$1.271 \cdot 10^6$

^a Señal obtenida para la transición de cuantificación.

A continuación, se determinó la temperatura óptima de la columna, llevando a cabo diferentes experiencias a distintas temperaturas (25, 30 y 35 °C). Los resultados se muestran en la *Tabla 5*, reflejando que las sensibilidad de los compuesto a una temperatura de 30 y de 35 °C eran muy similares, por lo que finalmente se decidió seleccionar la temperatura de 30 °C como temperatura óptima del proceso cromatográfico.

Tabla 5. Influencia de la temperatura de columna en la intensidad de pico

Compuesto	Intensidad de pico^a		
	<i>Temperatura 25 °C</i>	<i>Temperatura 30 °C</i>	<i>Temperatura 35 °C</i>
<i>Verde de malaquita</i>	$3.989 \cdot 10^4$	$5.213 \cdot 10^4$	$5.132 \cdot 10^4$
<i>Cristal violeta</i>	$5.208 \cdot 10^4$	$5.321 \cdot 10^4$	$5.624 \cdot 10^4$
<i>Verde de leucomalaquita</i>	$1.621 \cdot 10^5$	$2.691 \cdot 10^5$	$2.534 \cdot 10^5$

^a Señal obtenida para la transición de cuantificación.

Finalizado la optimización de estos parámetros y en vista de que los tiempos de retención de los compuestos analizados estaban comprendidos entre 2.1 y 2.7 min, se decidió modificar el gradiente empleado, reduciendo el tiempo total de análisis, véase en la *Tabla 1* en la sección 3.3, el gradiente finalmente empleado.

Posteriormente, con el fin de seleccionar el tiempo de adquisición óptimo (*dwell time*) para cada una de las masas monitorizadas, se evaluaron diversos valores (0.005, 0.010, 0.025, 0.05 y 0.1 s) para cada uno de los cuatro compuestos. Se seleccionó como tiempo de adquisición óptimo el valor de 0.05 s, obteniendo picos bien definidos, y adquiriendo suficientes puntos por pico (superiores a 10) para una cuantificación

repetitiva y fiable de los compuestos en cuestión (Figura 16).

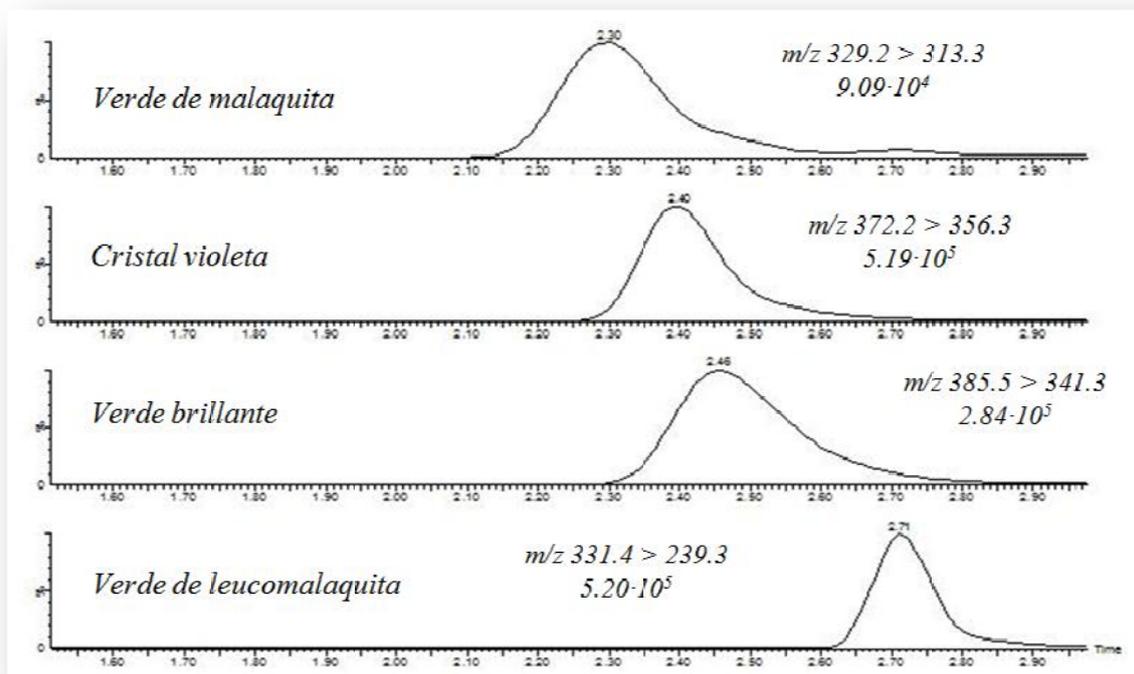


Figura 16. Cromatograma obtenido con un tiempo de adquisición de 0.05 s

Bajo estas condiciones optimizadas, los tiempos de retención de los colorantes objeto de estudio se mantuvieron constantes, en el rango de 2.1 (verde de malaquita) y 2.7 min (verde de leucomalaquita). La determinación de los compuestos seleccionados se consigue mediante una sola función de adquisición, que se encuentra comprendida entre 1 y 3 min. A pesar de que todos los compuestos aparecen en un tiempo relativamente corto, lo cual podría dificultar la resolución cromatográfica, no existen problemas para su determinación debido a que poseen resolución espectral (distintos iones precursores y producto), otorgada por la alta selectividad de la MS/MS, que hace que la separación cromatográfica no sea tan decisiva así como de los iones precursores.

Finalmente, se debe indicar que pese a no haber experimentado gran parte del proceso de optimización, el verde brillante, al ser un compuesto con propiedades similares a los otros tres que se han incluido desde un principio en la optimización, no

existió ningún tipo de problema para determinarlo bajo las condiciones establecidas para los demás.

4.2. Optimización del procedimiento de extracción

La optimización del procedimiento de extracción es una etapa crucial para lograr un método que determine los distintos colorantes objeto de estudio a las bajas concentraciones que se pretenden alcanzar. Además, y siguiendo con las actuales tendencias en la etapa de tratamiento de muestra, se trató de desarrollar un método rápido y fiable, que permitiese reducir de manera significativa el tiempo de extracción en comparación con los métodos tradicionales. Para ello se decidió partir de un método basado en la metodología QuEChERS, pero sin incluir la etapa de limpieza basada en la extracción en fase sólida dispersiva. Este método fue elegido ya que ha proporcionado resultados muy provechosos especialmente en análisis de residuos orgánicos en vegetales y otras matrices, además de ser un método muy rápido y sencillo de llevar a cabo.

En primer lugar, se procedió a examinar procedimientos basados en métodos QuEChERS existentes adoptados por distintos organismos internacionales como oficiales, es decir, el método oficial adoptado en Europa (caracterizado por el uso de sales citrato) [80] y el utilizado en Estados Unidos (que se caracteriza por emplear sales acetato) [81].

Con el fin de lograr un método adecuado para extraer los colorantes se optó por optimizar algunos de los parámetros (*Figura 17*) que determinan el método QuEChERS, como son:

- El tiempo de agitación (0, 30, 60 y 120 min).
- Tipos de sales, es decir, la utilización de las sales que corresponden al método QuEChERS oficial en Europa o el de los Estados Unidos.
- Diferentes disolventes de extracción (metanol, acetato de etilo o acetonitrilo) acidificado al 1% (v/v) en ácido acético.
- Tipo de ácido (ácido acético o ácido fórmico) empleado para acidificar al 1% (v/v) el disolvente de extracción.
- Dilución del extracto en la proporción 1:1 con fase móvil.

- Concentración del extracto a la mitad de su volumen inicial, utilizando para ello un Syncore line.
- Dilución del extracto concentrado con fase móvil en una proporción 1:1.

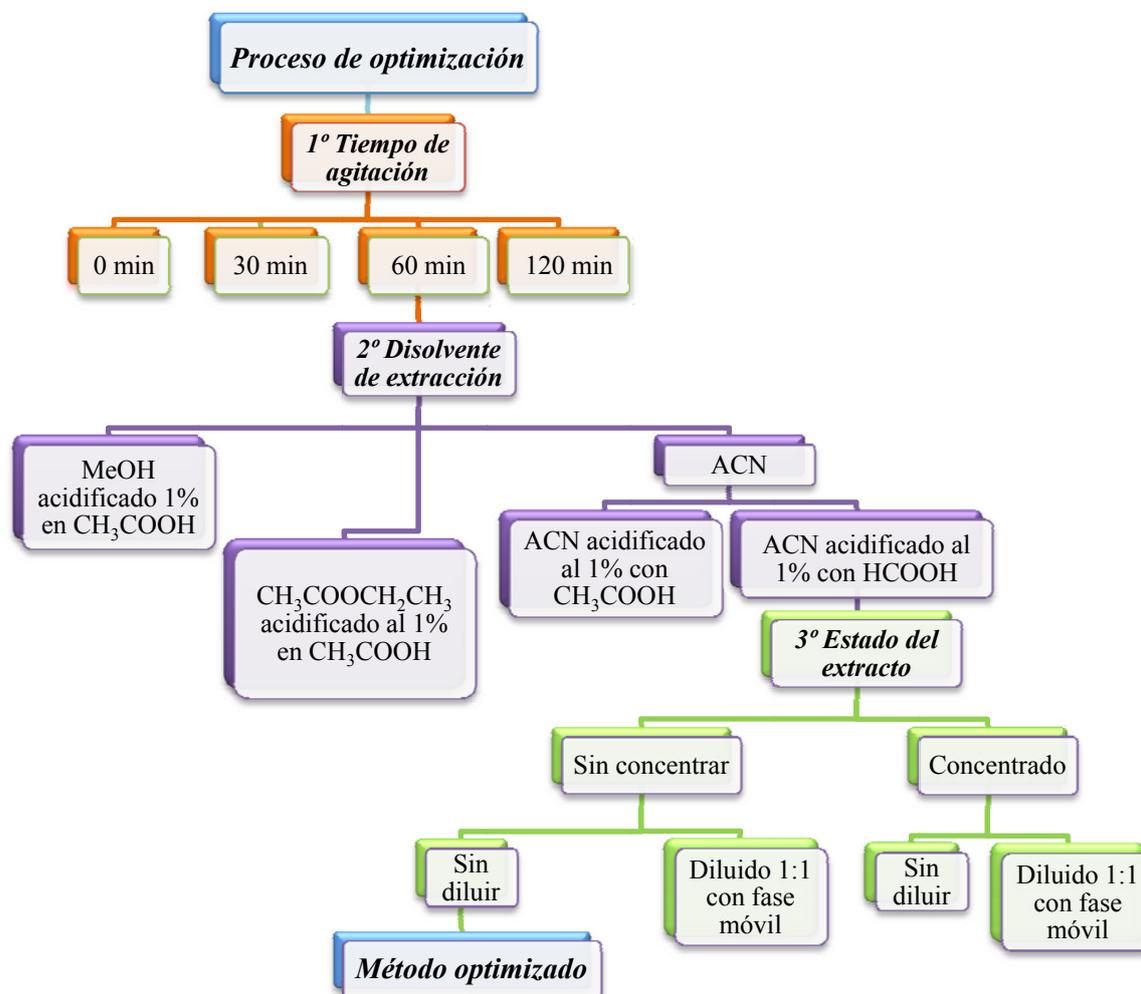


Figura 17. Esquema del proceso de optimización del método de extracción

Seguidamente, se detalla el procedimiento de extracción empleado (QuEChERS utilizando sales acetato) como punto de partida para la elaboración de un método de extracción óptimo. Asimismo, indicar que todas las experiencias del proceso de optimización se efectuaron a un nivel de fortificación de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

En primer lugar, se pesan 5 g de gamba en un tubo de centrífuga de 50 mL, se añaden 5 mL de agua Milli-Q y 10 mL de acetonitrilo al 1% (v/v) de ácido acético. A continuación, se agita durante 1 h en un agitador rotatorio. Seguidamente, se adicionan 4 g de sulfato sódico anhidro y 1 g de acetato sódico anhidro, y se agita

durante 1 min. Se centrifuga a 5000 rpm (4136 g) durante 5 min. Finalmente, se toma 1 mL de sobrenadante para ser analizado en el sistema UHPLC-QqQ-MS/MS.

A partir del procedimiento descrito, se examinaron los distintos parámetros a optimizar que se describen a continuación.

✓ **Evaluación del tiempo de agitación**

Inicialmente, se procedió a evaluar el tiempo de agitación, estudiando 0, 30, 60 y 120 min. Los resultados obtenidos, se muestran en la *Figura 18*, e indican que se lograron unas recuperaciones satisfactorias con un tiempo de agitación de 30 y 60 min, experimentando una fuerte disminución de la recuperación en dos de los compuestos (verde de malaquita y verde brillante) cuando no se agitaba la mezcla. Si la agitación se prolongaba hasta los 120 min, en general los datos de recuperaciones obtenidos eran inferiores a las que proporcionaba un tiempo de agitación de 60 min, salvo para el verde brillante, el cual experimentaba una recuperación anormalmente elevada (entorno a 160 %). Se puede indicar que, utilizando un tiempo de agitación de 60 min, las recuperaciones alcanzadas prácticamente eran del 100 % para tres de los compuestos (verde de leucomalaquita, cristal violeta y verde brillante), y próximas al 50 % para el verde de malaquita. No obstante, si se emplea una agitación de 30 min, pese a la similitud de los datos logrados para el verde de malaquita, leucomalaquita y cristal violeta con respecto a la agitación de 60 min, se obtenía un valor anormalmente alto del verde brillante (aproximadamente 220 %), el cual pudo ser motivado por cualquier tipo de co-extracción de cierto componente de la matriz, por lo que se excluyó este tiempo y se optó por emplear un tiempo de agitación de 60 min para experiencias futuras.

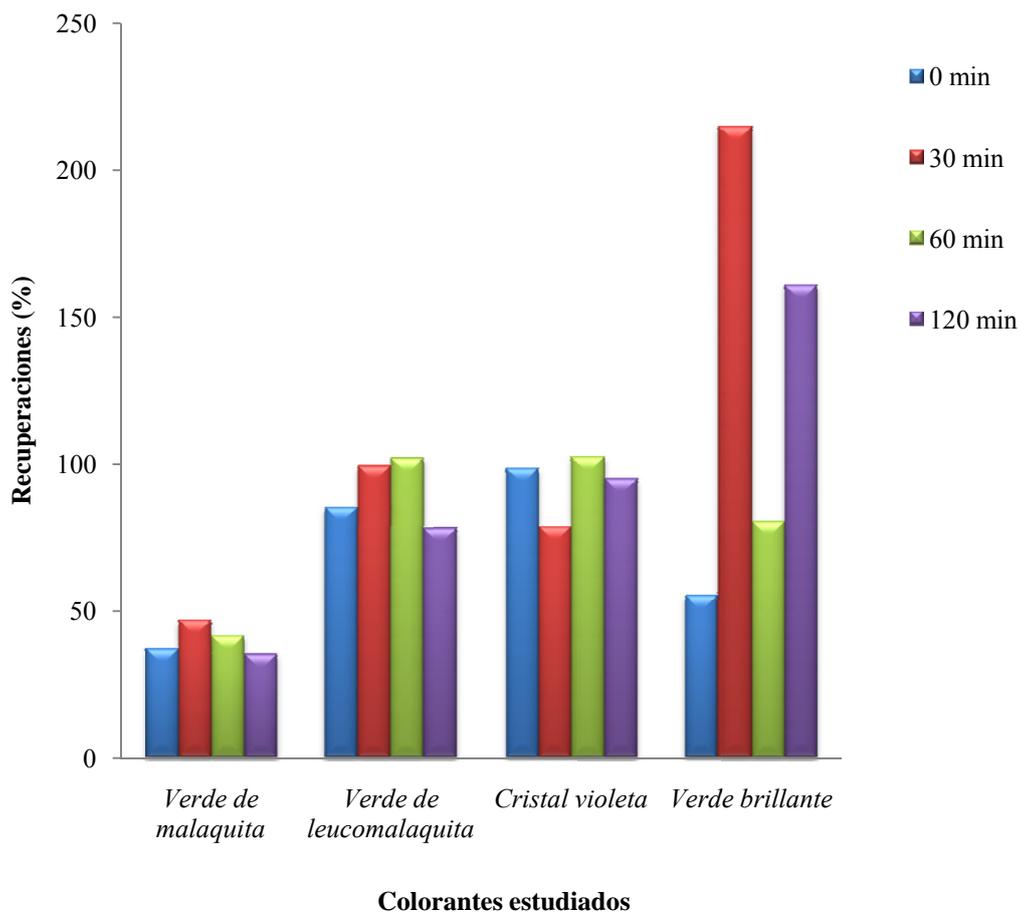


Figura 18. Datos de recuperaciones (%) obtenidos a distintos tiempos de agitación (0, 30, 60 y 120 min) empleando muestras de gambas fortificadas a una concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$

✓ Evaluación del tipo de sales

Una vez decidido el tiempo de agitación, se procedió a examinar los distintos tipos de sales que corresponden al método europeo (QuEChERS sales citrato) y al estadounidense (QuEChERS sales acetato). Por un lado, el método europeo emplea 4 g de sulfato magnésico anhidro, 5 g de cloruro sódico, 1 g de citrato trisódico y 0.5 g de citrato disódico, mientras que el método estadounidense usa únicamente 4 g de sulfato sódico anhidro y 1 g de acetato sódico anhidro. Ambos métodos se realizaron empleando como disolvente de extracción acetonitrilo acidificado en ácido acético al 1% (v/v).

Como se puede advertir en la *Tabla 6*, se consiguen valores muy similares a través de ambos métodos para todos los compuestos excepto para el verde brillante,

colorante que con las sales citrato se recupera a un porcentaje muy inferior a los logrados cuando se utiliza el método QuEChERS con sales acetato.

Tabla 6. Valores de recuperaciones (%) obtenidos con los dos diferentes métodos de extracción empleando muestras de gambas fortificadas a una concentración de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$

<i>Compuesto</i>	<i>QuEChERS citrato</i>	<i>QuEChERS acetato</i>
<i>Verde de malaquita</i>	65.4 (5.8) ^a	55.1 (5.0)
<i>Cristal violeta</i>	96.8 (1.7)	102.1 (7.4)
<i>Verde brillante</i>	39.0 (27.9)	76.0 (4.8)
<i>Verde de leucomalaquita</i>	103.2 (2.1)	100.3 (9.1)

^aValores de desviación estándar relativa (DER) obtenidos a partir de 3 réplicas.

✓ Evaluación del disolvente de extracción

Posteriormente, se evaluaron distintos disolventes de extracción utilizando sales acetato. Concretamente se comparó la eficacia de extracción del metanol y del acetato de etilo acidificadas al 1 % (v/v) con ácido acético, y se contrastó con los resultados alcanzados anteriormente con el acetonitrilo. En base a los datos mostrados en la *Tabla 7*, se puede indicar que ambos disolventes no resultaban eficaces para llevar a cabo este proceso. En el caso del metanol, la mayor parte de los colorantes no eran extraídos, mientras que con el acetato de etilo, se extraían todos los compuestos, excepto el cristal violeta. Además hay que indicar que se obtenían recuperaciones anormalmente altas para el verde de malaquita y el verde de leucomalaquita.

Por consiguiente, en vista de los resultados se concluyó que la utilización de acetonitrilo acidificado al 1% (v/v) con ácido acético ocasionaba los mejores resultados, originándose recuperaciones comprendidas entre el 55 y 103 %.

Tabla 7. Valores de recuperaciones (%) obtenidos utilizando diferentes disolventes en el procedimiento de extracción con sales acetato empleando muestras de gambas fortificadas a una concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$

Compuesto	Disolvente de extracción		
	<i>Acetonitrilo</i>	<i>Metanol</i>	<i>Acetato de etilo</i>
<i>Verde de malaquita</i>	55.1 (5.0) ^a	NE ^b	123.7 (5.6)
<i>Cristal violeta</i>	102.1 (7.4)	NE	62.4 (43.3)
<i>Verde brillante</i>	76.0 (4.8)	NE	NE
<i>Verde de leucomalaquita</i>	100.3 (9.1)	28.6 (2.5)	123.7 (5.6)

^aValores de desviación estándar relativa (DER) obtenidos a partir de 3 réplicas.

^bNE: No extraído.

✓ Evaluación del tipo de ácido

Una vez decidido el disolvente de extracción (acetonitrilo), se optó por probar distintos ácidos para acidificarlo. Hasta ahora todos las pruebas se habían realizado acidificando los disolventes al 1 % (v/v) con ácido acético, por lo que en esta ocasión se cambió el ácido acético por ácido fórmico. En la *Figura 19*, se puede observar como la acidificación del acetonitrilo con ácido fórmico mejoraba significativamente la extracción del verde de malaquita, el cual experimenta un incremento en su recuperación de casi un 20 %, en relación al valor obtenido con ácido acético. De igual modo, el resto de los colorantes también experimentaban un aumento del valor de sus recuperaciones, excepto el verde de leucomalaquita que sufría un leve descenso. En base a estos datos, se seleccionó finalmente el ácido fórmico.

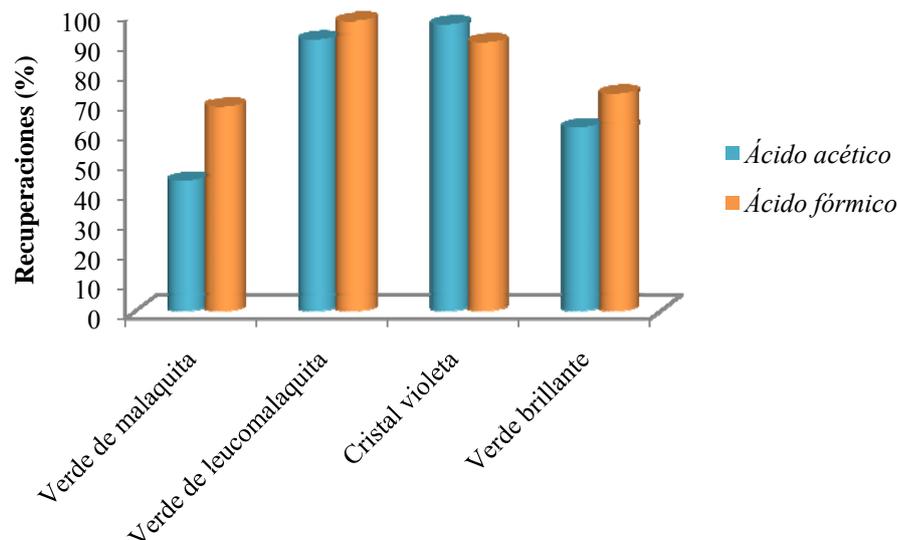


Figura 19. Valores de recuperaciones (%) obtenidos al utilizar distintos tipos de ácidos (acético o fórmico) para acidificar el disolvente de extracción, empleando muestras de gambas fortificadas a una concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$

✓ Concentración del extracto

Otro parámetro que puede influir en la obtención de unos resultados apropiados era la concentración o dilución del extracto final conseguido en la extracción. Por ello, se realizaron varias experiencias con el fin de averiguar las condiciones óptimas para los compuestos objeto de estudio. Se consideraron cuatro tipos de extractos, por un lado el extracto sin concentrar y éste mismo extracto diluido en la proporción 1:1 con fase móvil, y por otro lado, el extracto concentrado y el extracto concentrado diluido en la proporción 1:1 con fase móvil. Como se puede ver en la *Tabla 8*, los mejores resultados se lograban cuando el extracto no se concentraba ni se diluía con fase móvil. Cuando los extractos eran concentrados se obtenían valores de recuperaciones anormalmente altos para todos los colorantes con altas desviaciones estándar relativas (DER). Si bien, cuando estos extractos eran diluidos con fase móvil, las recuperaciones mejoraban considerablemente. Sin embargo, eran bastante similares a los hallados sin tener que emplear la etapa de concentración, por lo que ofrecía muchas más ventajas optar por no concentrar los extractos, y tampoco diluirlos, puesto que la dilución ocasionaba una gran disminución de la recuperación del colorante verde de malaquita, además de aumentar de manera considerable el tiempo de dicha etapa.

Tabla 8. Efecto de la dilución o concentración de los extractos en las recuperaciones (%) de los compuestos objeto de estudio, empleando muestras de gambas fortificadas a una concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$

Compuesto	QuEChERS ^a			
	Extractos sin concentrar		Extractos concentrados	
	Sin diluir	Diluidos con fase móvil	Sin diluir	Diluidos con fase móvil
Verde de malaquita	68.8 (7.4) ^b	28.6 (18.8)	167.0 (22.1)	99.5 (8.4)
Cristal violeta	90.2 (5.8)	68.6 (17.1)	231.7 (26.5)	114.9 (2.1)
Verde brillante	73.02 (28.5)	80.5 (18.5)	154.7 (27.4)	95.9 (7.7)
Verde de leucomalaquita	97.5 (3.4)	83.3 (8.5)	157.9 (20.8)	116.0 (7.0)

^aMétodo utilizando sales acetato con acetonitrilo al 1% en ácido fórmico.

^bValores de desviación estándar relativa (DER) obtenidos a partir de 3 réplicas.

Una vez finalizado el proceso de optimización, se procedió a comprobar la eficacia de dicho método fortificando una muestra de gamba con $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de los colorantes, siendo analizada mediante UHPLC-QqQ-MS/MS (Figura 20)

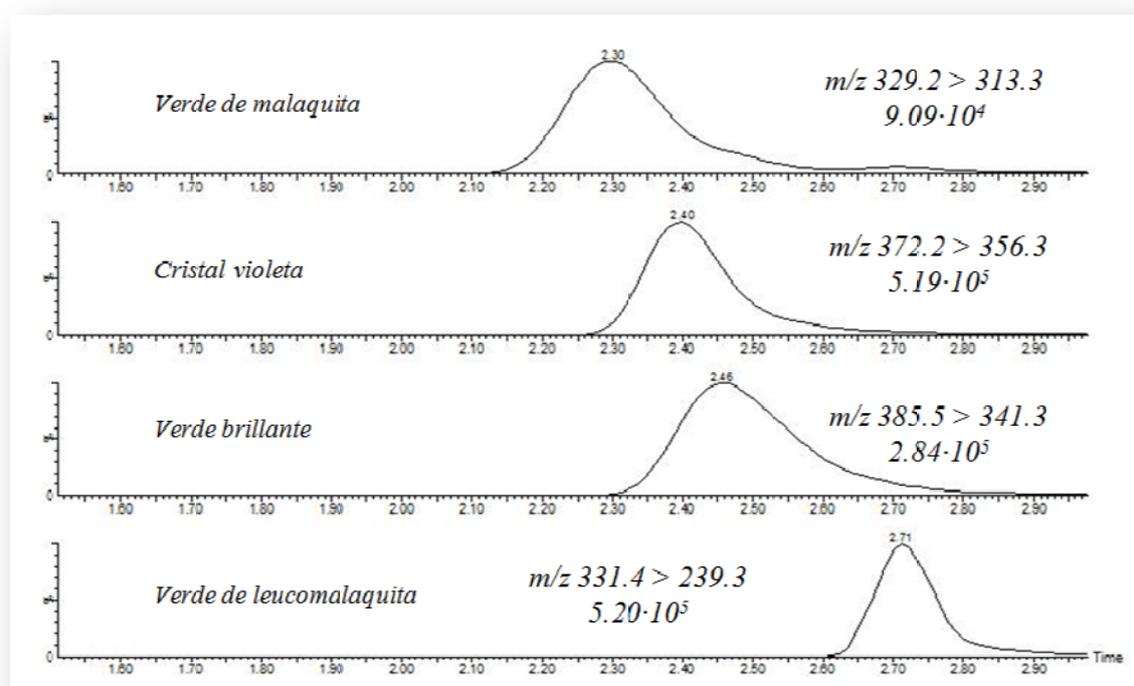


Figura 20. Cromatogramas obtenidos siendo empleado el método optimizado y analizado mediante UHPLC-QqQ-MS/MS

4.3. Evaluación del efecto matriz

Evaluar la existencia de efecto matriz resulta de gran importancia, puesto que este parámetro determina si se ha producido un cambio en la respuesta instrumental del analito como resultado de la presencia de otros componentes de la matriz estudiada, lo cual llevaría a cometer un error sistemático que depende de la concentración de analito de la muestra.

Existen diversas formas para evitar este efecto, siendo la utilizada en este caso la realización de una recta de calibrado en matriz. Para ello, se adicionaron concentraciones conocidas de los analitos seleccionados (2, 10, 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$) al blanco de matriz, es decir se preparan patrones en matriz, y se construye una recta de calibrado.

La presencia de efecto matriz se pone de manifiesto cuando se comparan gráficamente las pendientes de la recta de calibrado en disolvente y en matriz. Cuando ambas rectas tienen pendientes similares, no existe efecto matriz, mientras que si las pendientes son diferentes sí se considera que existe dicho efecto. La *Tabla 9* recoge las relaciones de las pendientes obtenidas para cada uno de los compuestos entre la recta de calibrado realizada en matriz y disolvente, advirtiéndose valores que no se encuentran comprendidos entre 0.8-1.2, lo cual indica la existencia de efecto matriz. Además, en la *Figura 21* se muestran como ejemplo las rectas correspondientes al colorante verde brillante, evidenciándose de manera gráfica la existencia de efecto matriz, por lo que para la cuantificación de las muestras analizadas, se debe emplear la calibración en matriz.

Tabla 9. Evaluación del efecto matriz obtenido como la relación entre la pendiente de la recta de calibrado en matriz y la pendiente de la recta de calibrado en disolvente

Compuesto	$b_{\text{disolvente}}$	b_{matriz}	$b_{\text{matriz}} / b_{\text{disolvente}}$
<i>Verde de malaquita</i>	868.5	460.5	0.5
<i>Cristal violeta</i>	3860.2	1526.8	0.4
<i>Verde brillante</i>	3618.4	1267.2	0.4
<i>Verde de leucomalaquita</i>	2798.5	1263.2	0.5

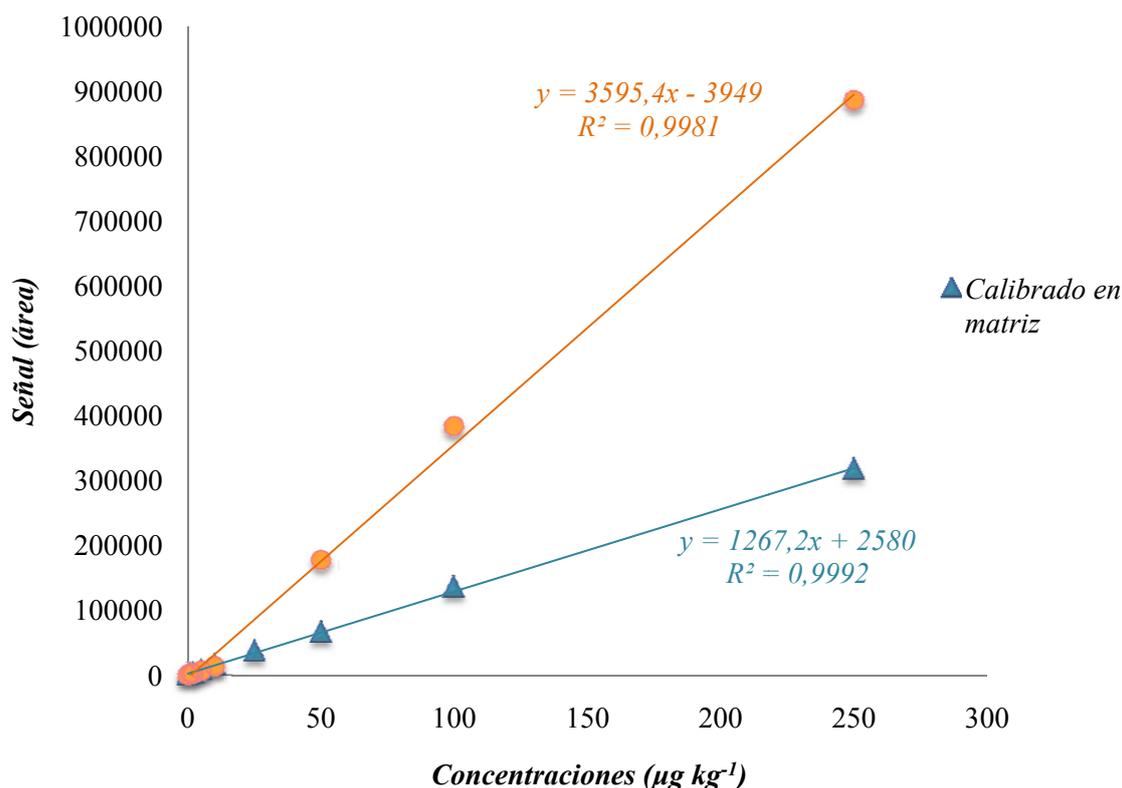


Figura 21. Gráfica sobre el efecto matriz en el caso concreto del colorante verde brillante

4.4. Validación del método analítico

Para la validación del método analítico desarrollado se procedió a examinar los parámetros de linealidad, veracidad, repetibilidad, precisión intermedia, límites de detección, límites de cuantificación y selectividad del método.

En primer lugar se debe indicar que la identificación de los distintos colorantes evaluados se realiza mediante las ventanas de tiempo de retención (VTRs) de cada compuesto, las cuales se definen como el promedio del tiempo de retención del compuesto \pm tres veces la desviación estándar de los tiempos de retención (Tabla 10), tras inyectar diez réplicas de un patrón en matriz ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabla 10. Valores de VTRs para cada uno de los compuestos evaluados

Compuesto	Verde de malaquita	Cristal violeta	Verde brillante	Verde de leucomalaquita
VTRs (min)	2.11-2.63	2.28-2.62	2.34-2.68	2.64-2.68

A continuación, se evaluó la linealidad del método utilizando para ello rectas de calibrado en matriz, consiguiéndose una buena linealidad y obteniendo valores de R^2 superiores a 0.99 para todos los compuestos objeto de estudio en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 1 y 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Las rectas de calibrado se obtuvieron por medio de mínimos cuadrados que relacionan la señal analítica (área de pico) con la concentración conocida de las muestras patrón empleadas.

La evaluación de la veracidad se realizó a través de los datos de recuperaciones obtenidos tras la extracción de muestras de gamba fortificada realizando tres réplicas por nivel, a cuatro niveles de concentración diferentes (2, 10, 25 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Los resultados se muestran en la *Tabla 11*, observándose valores comprendidos entre 48-94 % para 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 66-103% para 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 78-109% para 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 75-112% para 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Señalar que aunque para el verde de malaquita se obtenían recuperaciones del 48 % al nivel de fortificación de 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, el método de análisis era repetitivo, por lo que la metodología desarrollada se podría utilizar en análisis de rutina, aplicando el correspondiente factor corrector cuando se detectaban bajas concentraciones del presente compuesto.

Tabla 11. Resultados de las recuperaciones y repetibilidad

<i>Compuesto</i>	<i>Recuperación (%)</i>			
	2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$
<i>Verde de malaquita</i>	48 (9) ^a	66 (13)	78 (4)	75 (6)
<i>Cristal violeta</i>	94 (15)	103 (5)	109 (1)	112 (2)
<i>Verde brillante</i>	81 (4)	90 (1)	97 (2)	100 (2)
<i>Verde de leucomalaquita</i>	81 (11)	69 (9)	87 (9)	102 (14)

^aValores de repetibilidad expresados como desviación estándar relativa (DER) (número de réplicas = 3).

La precisión del método se estimó a través de los datos de repetibilidad y los estudios de precisión intermedia (precisión inter-día), expresándose los resultados como valores de DER. La repetibilidad se evalúa a los mismos niveles empleados para calcular la veracidad. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 11*, mostrando valores de DER comprendidos entre 1 y 15 % para los cuatro niveles distintos estudiados (2, 10, 25 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

La precisión intermedia se examinó mediante cuatro niveles de concentración (2, 10, 25 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) durante cinco días distintos. Los resultados conseguidos se muestran en la *Tabla 12*, obteniéndose valores de DER inferiores al 25 % en todos los compuestos. Por consiguiente, estos datos junto con los de repetibilidad demuestran que el método desarrollado posee una adecuada precisión.

Los límites inferiores del método, LODs y LOQs se calcularon a partir de la relación señal/ruido, logrando valores de LODs que van desde 0.03 a 0.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y valores de LOQs comprendidos entre 0.10 y 0.33 $\mu\text{g kg}^{-1}$, como queda recogido en la *Tabla 12*. Se debe destacar que los límites de cuantificación alcanzados son inferiores a los MRPLs (2 $\mu\text{g kg}^{-1}$) establecidos por la UE para este tipo de compuestos en carne de productos del mar [36].

Finalmente, la selectividad del método se estableció mediante el análisis de blancos. Se puede determinar la selectividad del método observando la ausencia de señales que presenten los mismos tiempos de retención que los colorantes estudiados y que pudiesen originar falsos positivos. Examinando los cromatogramas de los blancos se comprobó que no existían ningún tipo de señal al mismo tiempo de retención característico de cada compuesto en ninguna de las transiciones estudiadas, indicando la selectividad del método desarrollado y de este modo, eliminar la posibilidad de que se produzcan falsos positivos.

Tabla 12. Evaluación de la precisión intermedia, LOD y LOQ

Compuesto	Precisión intermedia ^a				LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^c
	2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
Verde de malaquita	24	14	12	16	0.10	0.33
Cristal violeta	7	2	7	13	0.10	0.33
Verde brillante	2	1	6	9	0.10	0.33
Verde de leucomalaquita	20	11	23	13	0.03	0.10

^aValores expresados como DER.

^bLímite de detección (LOD) determinado como la concentración a la cual la relación S/N = 3.

^cLímite de cuantificación (LOQ) determinado como la concentración a la cual la relación S/N = 10.

4.5. Análisis de muestra reales

El método desarrollado y validado se aplicó al análisis de muestras reales. Concretamente, se analizaron diez muestras de gamba procedentes de distintos centros comerciales localizados en la provincia de Almería. Además, con el fin de asegurar la calidad de los resultados, se realizó un control de calidad interno que consistió en preparar una recta de calibrado en matriz, un blanco de matriz y una muestra blanca de gamba fortificada a $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Los análisis revelaron la ausencia de los colorantes estudiados por encima del LOQ del método en las diez muestras de gamba examinadas.

V. CONCLUSIONES

Entre las principales conclusiones que se pueden obtener del presente trabajo, se destacan las mostradas a continuación:

- Se ha desarrollado un método cromatográfico que permite el análisis de los cuatro colorantes objeto de estudio en un tiempo de 5.5 minutos.
- Se ha procedido a desarrollar un método basado en el procedimiento QuEChERS, permitiendo la extracción simple y rápida de los colorantes seleccionados, algo que resulta completamente nuevo tratándose de la determinación simultánea de verde de malaquita, verde de leucomalaquita, cristal violeta y verde brillante en una matriz como son las gambas mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
- La técnica desarrollada permite alcanzar LOQs muy inferiores a los MRPLs que impone la UE para estos compuestos en productos del mar.
- El método optimizado proporcionó valores adecuados para los parámetros estudiados durante la validación del mismo.

VI. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Una vez finalizado el presente trabajo fin de máster, se pueden realizar nuevas propuestas que permitan seguir avanzando y mejorando el procedimiento descrito.

De este modo, se propone lo siguiente:

- Incorporar nuevos colorantes que también sean empleados en acuicultura al método, de manera que se consiga un método mucho más completo y eficaz.
- Comprobar la eficacia del método en otro tipo de matrices como el salmón o la trucha.

VII. REFERENCIAS

- [1] FAO (2011, Enero 31). *El consumo de pescado alcanza niveles históricos*. Acceso en febrero de 2011, de <http://www.fao.org/news/story/es/item/50260/icode/>.
- [2] *El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA)*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma, 2010. Acceso en noviembre de 2010, de <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.htm>.
- [3] G. Barnabé, *Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura*, Zaragoza: Acribia, 1996.
- [4] G. Barnabé, *Acuicultura*, Barcelona: Ediciones Omega, 1991.
- [5] F. Castelló Orvay, *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnológicos de la producción*, Barcelona: Universitat, Publicacions, 1993.
- [6] Cf. EC *Rapid alert report for food and feed 2006*. Acceso en noviembre de 2010, de http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2006_en.pdf.
- [7] Cf. EC *Rapid alert report for food and feed 2009*. Acceso en noviembre de 2010, de http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.
- [8] *Report about risk assesement of malachite green in food*, 2007. Acceso en noviembre de 2010, de <http://www.food.dtu.dk>.
- [9] E. Sudova, J. Machova. *Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish*. *Veterinari Medicina*, 52 (2007) 527-539.
- [10] A.B.A. Boxall, D.W. Kolpin, B. Halling-Sørensen. *Are veterinary medicines causing environmental risk?* *Environmental Science and Technology*, 37 (2003) 286A-294A.
- [11] J. Kim. *The use of vital dyes in corneal disease*. *Current Opinion Ophthalmology*, 11 (2000) 241-247.
- [12] *Comisión Europea, Reglamento N° 1333/2008, del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios*. Publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea, 31-Diciembre-2008, L354; 16-33.
- [13] E. Lindner. *Toxicología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, D.L. 1994.
- [14] *Real decreto 2001/1995*, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Publicado en el Boletín Oficial del Estado, 22-Enero-1996, BOE núm. 19; 1884-1895.

- [15] S.P. Alves, D.M. Brum, E.C. Branco de Andrade, A.D. Pereira Netto. *Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection*. Food Chemistry, 107 (2008) 489-496.
- [16] S. Srivastava, R. Sinha, D. Roy. *Toxicological effects of malachite green*. Aquatic Toxicology, 66 (2004) 319-329.
- [17] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (70th: 2008: Geneva, Switzerland). *Evaluation of certain veterinary drug residues in food: seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*.
- [18] J.L. Tojo, M.T. Santamarina. *Attempts at oral pharmacological treatment of Ichthyophthirius multifiliis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*. Journal of Fish Diseases, 24 (2001) 249-252.
- [19] T. Hecht, F. Endemann. *The impact of parasites, infections and diseases on the development of aquaculture in sub-Saharan Africa*. Journal of Applied Ichthyology, 14 (1998) 213-221.
- [20] R.E. Campbell, J.H. Lilley, V. Taukhid, V. Panyawachira, S. Kanchanakhan. *In vitro screening of novel treatments for Aphanomyces invadans*. Aquaculture Research, 32 (2001) 223-233.
- [21] K. Molnar. *Effect of exposure to malachite green solution on common carp fry with Dactylogyrus vastator (monogea) infection*. Acta Veterinaria Hungarica, 43 (1995) 277-286.
- [22] S.J. Culp, P.W. Mellick, R.W. Trotter, K.J. Greenless, R.L. Kodell and F.A. Beland. *Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green*. Food and Chemistry Toxicology, 44 (2006) 1204-1212.
- [23] S.M. Plakas, K.R. El Said, G.R. Stehly, W.H. Gingerich, J.L. Allen, Can. *Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (Ictalurus punctatus)*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53 (1996) 1427-1433.
- [24] J.E. Roybal, A.P. Pfenning, R.K. Munns, D.C. Holland, J.A. Hurlbut, A.R. Long. *Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in catfish (Ictalurus punctatus) tissue by liquid chromatography with visible detection*. Journal of AOAC International, 78 (1995) 453 -457.
- [25] S.J. Culp, F.A. Beland, R.H. Heflich, R.W. Benson, L.R. Blankenship, P.J. Webb, P.W. Mellick, R.W. Trotter, S.D. Shelton, K.J. Greenlees, M.G. Manjanatha. *Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed*

leucomalachite green. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 506/607 (2002) 55-63.

[26] *Chemical Regulations Directorate, Heath the Safety Executive*, United Kingdom, Proposal for Harmonised Classifications and Labelling, 2010. Acceso en noviembre de 2010, de

http://echa.europa.eu/doc/consultations/cl/clh_axvrep_uk_leucomalachite_green.pdf

[27] R. Docampo, R.P.A Muniz, F.S Cruz, R.P Mason. *Light-enhanced free radical formation and trypanocidal action of gentian violet (crystal violet)*. Science, 220 (1983) 1292-1295.

[28] J. Thompson, C. Harold, L.G. Rushing, T. Gehring, R. Lochmann. *Persistence of gentian violet and leucogentian violet in canal catfish (ictalurus punctatus) muscle after water-borne exposure*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 723 (1999) 287-291.

[29] D.R. Doerge, M.I. Churchwell, T.A. Gehring, Y.M. Pu, S.M. Plakas. *Analysis of Malachite Green and Metabolito in Fish Using Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 12 (1998) 1625-1634.

[30] M. Balabanova, L. Popova, R. Tchipeva. *Dyes in dermatology*. Disease-a-Month, 50 (2004) 270-279.

[31] K.K. Karukstis, A.V. Gullledge, *Analysis of the solvatochromic behavior of the disubstituted triphenylmethane dye brilliant green*. Analytical Chemistry, 70 (1998) 4212-4217.

[32] H. Tavallali, M. Ostova. *Trace spectrophotometric determination of brilliant green in fish farming water samples*. International Journal of ChemTech Research, 1 (2009) 199-203.

[33] K.G. Bhattacharyya, A. Sarma. *Adsorption characteristics of the dye, brilliant green, on Neem leaf powder*. Dyes and Pigments, 57 (2003) 211-222.

[34] *Comisión Europea, Reglamento N° 854/2004 del parlamento europeo y del consejo*, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea, 25 Junio-2004, L226; 83-127.

- [35] G. Chen, S. Miao. *HPLC Determination and MS confirmation of malachite green, gentian violet, and their leuco metabolite residues in channel catfish muscle*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (2010) 7109-7114.
- [36] *Comisión Europea, Decisión de 22 de diciembre de 2003 (2004/25/EC)* por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para la determinación de residuos en alimentos de origen animal. Publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea, 30 Abril-2004, L142; 12-23.
- [37] M.D. Hernando, M. Mezcuá, J.M. Suárez-Barcelona, A.R. Fernández-Alba. *Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutic residues in salmon*. Analytica Chimica Acta, 562 (2006) 176–184.
- [38] G. Dowling, P.P.J. Mulder, C. Duffy, L. Regan, M.R. Smyth. *Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 586 (2007) 411-419.
- [39] M.J. Martínez, S. Herrera, A. Uclés, A. Agüera, M.D. Hernando, O. Shimelis, M. Rudolfsson, A.R. Fernández-Alba. *Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 665 (2010) 47-54.
- [40] A.A. Bergwerff, P. Scherpenisse. *Determination of residues of malachite green in aquatic animals*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 788 (2003) 351-359.
- [41] W.C. Andersen, S.B. Turnipseed, J.E. Roybal. *Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (2006) 4517-4523.
- [42] X. Wu, G. Zhang, Y. Wu, X. Hou, Z. Yuan. *Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1172 (2007) 121-126.
- [43] C. Long, Z. Mai, B. Zhu, X. Zou, Y. Gao, X. Huang. *New oxidant used for the post-column derivatization determination of malachite green and leucomalachite green*

- residues in cultured aquatic products by high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 1203 (2008) 21-26.
- [44] C. Long, Z. Mai, Y. Yang, B. Zhu, X. Xu, L. Lu, X. Zou. *Determination of multi-residue for malachite green, gentian violet and their metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography coupled with molecularly imprinted solid-phase extraction.* Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 2275-2281.
- [45] C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal. *Toma y tratamiento de muestras.* Madrid: Síntesis D.L. 2002.
- [46] S. Ahn, B. Kim, Y. Lee, J. Kim. *Accurate Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Fish using Isotope Dilution Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (ID-LC/MS).* Bulletin of the Korean Chemical Society 31 (2010) 3228-3232.
- [47] K. Mitroska, A. Posyniak, J. Zmudzki. *Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection.* Journal of Chromatography A, 1089 (2005) 187-192.
- [48] L. Valle, C. Díaz, A.L. Zanocco, P. Richter. *Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1067 (2005) 101-105.
- [49] W.C. Andersen, S.B. Turnipseed, C.M. Karbiwnyk, R.H. Lee, S.B. Clark, W.D. Rowe, M.R. Madson, K.E. Miller. *Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: malachite green, cristal (gentian) violet, and brilliant green.* Analytica Chimica Acta, 637 (2009) 279-289.
- [50] Y. Tao, D. Chen, X. Chao, H. Yu, P. Yuanhu, Z. Liu, L. Huan, Y. Wang, Z. Yuan. *Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in shrimp and salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with accelerate solvent extraction and auto solid-phase clean-up.* Food Control, 22 (2011) 1246-1252.
- [51] G. Stoev, A. Stoyanov. *Comparison of the reliability of the identification with diode array detector and mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1150 (2007) 302-311.
- [52] Z. Guo, P. Gail, T. Hao, J. Duan, S. Wang. *Determination of Malachite Green Residues in Fish Using a Highly Sensitive Electrochemiluminescence Method Combined*

with *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 5257-5262.

[53] A. Afkhami, R. Moosavi, T. Madrakina. *Preconcentration and spectrophotometric determination of low concentration of malachite green and leuco-malachite green in water samples by high performance solid phase extraction using maghemite nanoparticles*. *Talanta*, 82 (2010) 785-789.

[54] R. Romero, A. Garrido, J.L. Martínez, O.D. Prestes, S.L. Grió. *Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1477-1485.

[55] M. Anastassiades, S.J. Lehotay S.J, D. Stajnbaher, F.J. Schenk, *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in procedure*. *Journal of AOAC International*, 86 (2003) 412–431.

[56] J.Y. Park, J.H. Choi, A.M. Abd El-Aty, B.M. Kim, J.H. Oh, J.A. Do, K.S. Kwon, K.H. Shim, O.J. Choi, S. C. Shin, J.H. Shim. *Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method*. *Food Chemistry*, 128 (2011) 241-253.

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

[58] S.J. Lehotay, A. Dekok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven. *Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection*. *Journal of AOAC International*, 88 (2005) 595-614.

[59] M.M. Aguilera, P. Plaza, R. Romero, J.L. Martínez, A. Garrido. *Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (2011) 2863-2875.

[60] S.C. Cunha, J.O. Fernandes. *Development and validation of a method base don a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products*. *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 600-609.

- [61] J.L. Martínez, A. Garrido, M.M. Aguilera, R. Romero. *Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397 (2010) 2777-2790.
- [62] J. Keegan, M. Whelan, M. Danaher, S. Crooks, R. Sayers, A. Elliott, D. Brandon, A. Furey, R. O'Kennedy. *Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-Biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction*. Analytica Chimica Acta, 654 (2009) 111-119.
- [63] G. Stubbing, T. Bigwood. *The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach*. Analytica Chimica Acta, 637 (2009) 68-78.
- [64] L.G. Rushing, S.F. Webb, H.C. Thompson Jr. *Determination of leucogentian violet and gentian violet in catfish tissue by high-performance liquid chromatography with visible detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 674 (1995) 125-131.
- [65] D.R. Doerge, M.I. Churchwell, L.G. Rushing, S. Bajic. *Confirmation of gentian violet and its metabolite leucogentian violet in catfish muscle using liquid chromatography combined with atmospheric pressure ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 10 (1996) 1479-1484.
- [66] J.A. Tarbin, K.A. Barnes, J. Bygrave, W.H.H. Farnington. *Screening and confirmation of triphenylmethane dyes and their leuco metabolites in trout muscle using HPLC-vis and ESP-LC-MS*. Analyst, 123 (1998) 2567-2571.
- [67] M.A. Sogorb Sánchez. *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2006.
- [68] S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, A.P. Pfenning, P.J. Kijak. *Use of ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products*. Analytica Chimica Acta, 483 (2003) 373-386.

- [69] D. Hurtaud-Pessel, P. Couëdor, E. Verdon. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of dye residue in aquaculture products: Development and validation*. Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 1632-1645.
- [70] D. Arroyo, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, F. Palacios. *Determination and identification, according to European Union Decision 2002/657/EC, of malachite green and its metabolite in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an optimized extraction procedure and three-way calibration*. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 5472-5482.
- [71] P. Sherpenisse, A.A. Bergwerff. *Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 529 (2005) 173-177.
- [72] K. Halme, E. Lingfors, K. Petonen. *A confirmatory analysis of malachite green residues in rainbow trout with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (Application note)*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 845 (2007) 74-79.
- [73] T. Ding, J. Xu, B. Wu, H. Chen, C. Shen, F. Liu and K. Wang. *LC-MS/MS determination of malachite green and leucomalachite green in fish products*. Thermo Scientific Application Note, 2007.
- [74] L.G. Rushing, E.B Jr Hansen. *Confirmation of malachite green, gentian violet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection*. Journal of Chromatography B, 700 (1997) 223-231.
- [75] J.L. Allen, J.R. Meinertz. *Post-column reaction for simultaneous analysis of chromatic and leuco forms of malachite green and cristal violet by high-performance liquid chromatography with photometric detection*. Journal of Chromatography, 536 (1991) 217-222.
- [76] C.A.J. Hajee, N. Haagsma. *Simultaneous determination of malachite green and its metabolite leucomalachite green in eel plasma using post-column oxidation*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 669 (1995) 219-227.
- [77] A. Garrido, J.L. Martínez, E. Pastor, R. Romero. *High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390 (2008) 947-959.

- [78] M. Petrovic, M. Gros, D. Barcelo. *Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*, Journal of Chromatography A. 1124 (2006) 68-81.
- [79] Z. Bajc, D. Z. Doganoc, K. Sinigoj. *Determination of malachite green and leucomalachite green in trout and carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection*. Slovenian Veterinary Research, 44 (2007) 81-90.
- [80] CEN StandardMethod EN 15662: *Food of plant origin-determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/portioning and clean-up by dispersive SPE QuEChERS method*. Acceso en marzo de 2011, de www.cen.eu.
- [81] AOAC Official Method 2007.01. *Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate*.