

# Trabajo Fin de Máster

Facultad de Ciencias Experimentales



**Caracterización y análisis de difenoconazol en  
formulados de plaguicidas mediante cromatografía  
de gases–espectrometría de masas**

**Characterization and analysis of difenoconazol in  
pesticides formulations using gas chromatography–  
mass spectrometry**

*María del Mar Rovira Cruz  
Curso académico 2019-2020  
Septiembre 2020*



**Caracterización y análisis de difenoconazol en formulados de plaguicidas  
mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas**

Memoria del Trabajo Fin de Máster en “Laboratorio Avanzado de Química”  
presentada por

María del Mar Rovira Cruz

Almería, 1 de septiembre de 2020

Fdo: María del Mar Rovira Cruz

Fdo.: José Luis Martínez Vidal

Fdo.: Francisco Javier Arrebola Liébanas

# **MEMORIA**

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	7
<b>2. ABSTRACT</b> .....	7
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>3.1 FUNGICIDAS</b> .....	9
<b>3.2 PLAGUICIDA OBJETO DE ESTUDIO</b> .....	11
<b>3.3 FORMULADOS DE PLAGUICIDAS</b> .....	14
<b>3.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DIFENOCONAZOL</b> .....	14
3.4.1 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN: MICRO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA .....	14
3.4.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS CROMATOGRÁFICAS: CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN .....	17
<b>3.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>5. MÉTODOS EXPERIMENTALES</b> .....	19
<b>5.1 PATRONES Y REACTIVOS EMPLEADOS</b> .....	19
<b>5.2 MATERIALES Y EQUIPOS</b> .....	20
<b>5.3 DISOLUCIONES PATRÓN</b> .....	20
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
<b>6.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO</b> .....	20
<b>6.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN</b> .....	25
6.2.1 Estudio del tipo de técnica de SPME .....	25
6.2.2 Estudio del tipo de fibra .....	26
6.2.3 Estudio de la temperatura de incubación de la muestra .....	27
6.2.4 Estudio del tiempo de extracción de la muestra.....	28
<b>6.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS</b> .....	29
6.3.1 Optimización de la temperatura del inyector .....	29
6.3.2 Determinación del tiempo de cierre de la válvula del inyector.....	30
6.3.3 Optimización final de la rampa de temperaturas.....	31
<b>6.4 ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO</b> .....	32
6.4.1 Selectividad.....	33
6.4.3 Límites de detección y cuantificación.....	35
6.4.4 Precisión.....	36
6.4.5 Veracidad.....	36
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	37
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	38
<b>9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	42
<b>10. ANEXOS</b> .....	44

<b>10.1 ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>44</b>
<b>10.2 ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>45</b>

## **1. RESUMEN**

Se ha realizado un estudio para la caracterización y análisis del fungicida difenoconazol, perteneciente a la familia de los triazoles, en formulaciones del plaguicida que contienen este principio activo. La técnica analítica que se ha empleado ha sido la cromatografía de gases con un sistema de detección de espectrometría de masas (GC-MS). Asimismo se ha seleccionado la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) en modo espacio-cabeza (HS) a fin de realizar la separación del analito de la matriz del formulado, por su alta capacidad para automatizar el proceso con el posterior análisis cromatográfico. La etapa de caracterización espectrométrica y separación cromatográfica se ha llevado a cabo experimentalmente en el laboratorio, si bien la etapa de validación del método se ha estudiado bibliográficamente, a partir de la discusión sobre los parámetros de validación estudiados en cuatro artículos seleccionados relativos al análisis del compuesto en diferentes tipos de muestras.

**Palabras clave:** *Difenoconazol, formulados, HS-SPME-GC-MS, validación.*

## **2. ABSTRACT**

A study has been performed for the characterization and analysis of the difenoconazole fungicide, belonging to the family of triazoles in pesticide formulations that contain this active principle. The analytical technique used has been gas chromatography with a system of detection of mass spectrometry (GC-MS). Also, it has been selected the Solid Phase Micro Extraction (SPME) in mode Head-Space (HS), for the aim of separate the analyte from the formulation matrix, for its high capacity to automate the process with subsequent chromatographic analysis. The steps of spectrometric characterization and chromatographic separation have been performed in the laboratory, while the validation of the method has been studied from a bibliographic research, explaining the validation parameters studied in four papers related to the analysis of the compound in different type of samples.

**Key words:** *Difenoconazole, formulations, HS-SPME-GC-MS analysis, validation.*

### 3. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son familias de compuestos químicos, generalmente de carácter orgánico, que han sido tradicionalmente usados para la lucha contra las plagas. Se conocen varias decenas de familias de estas sustancias, que a partir de mediados del siglo pasado en general proceden de síntesis química. Sin embargo, desde la antigüedad se han usado sustancias naturales para este mismo fin. Estas diversas familias de sustancias que integran a cientos de compuestos presentan propiedades químico-físicas y características toxicológicas muy diversas, que afectan a su persistencia en medio ambiente y en alimentos y que finalmente determinan el riesgo del compuesto concreto para la salud.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*) define plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”<sup>1</sup>.

El término plaguicida incluye en consecuencia a un grupo amplio de sustancias que ejercen diferentes efectos sobre plagas en animales o en plantas, tanto en el proceso productivo como durante el transporte y el almacenamiento hasta la comercialización y asimismo el término considera sustancias químicas que son utilizadas como agentes defoliantes o como reguladoras del crecimiento.

Se han propuesto distintas clasificaciones para los plaguicidas y sin duda dos de las más empleadas hacen referencia al uso para el que se emplea, la primera de ellas, y a la familia química a la que pertenece el compuesto, la segunda. Así, un plaguicida puede por ejemplo ser calificado de herbicida si se emplea para combatir malas hierbas, insecticida si se usa para combatir insectos perjudiciales en cultivos o rebaños, o fungicida si se destina a luchar contra hongos, por citar algunos ejemplos. Además se puede hablar de compuestos organoclorados u organofosforados, piretroides y triazoles, entre otros, si el compuesto en cuestión presenta en su molécula átomos o grupos funcionales que justifiquen la denominación de la familia. La pertenencia a una familia es una cuestión relevante porque determina en buena medida las propiedades químico-físicas del compuesto, su carácter más o menos polar, su capacidad para integrarse en los seres vivos y su metabolismo en los mismos, en consecuencia su bioacumulación en éstos, y su persistencia en el medio ambiente. En conjunto, la toxicocinética de estas sustancias determina el riesgo de su empleo para los seres vivos.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, *World Health Organization*) ha establecido un criterio para la clasificación de los plaguicidas en razón a su carácter toxicológico en función del estado físico del formulado y de su “Dosis Letal<sub>50</sub>”, diferenciando 4 clases de grupos de compuestos (**Tabla 1**).

**Tabla 1** – Clasificación toxicológica de plaguicidas según la WHO.<sup>2</sup>

Clasificación según los riesgos	Formulación líquida DL <sub>50</sub> * aguda		Formulación sólida DL <sub>50</sub> aguda		Ejemplos
	Oral	Dermal	Oral	Dermal	
<b>Clase I a</b> (Sumamente peligrosos)	>20	>40	>5	>10	Dieldrín Endrín
<b>Clase I b</b> (muy peligrosos)	20 a 200	40 a 400	50 a 50	10 a 100	DDT
<b>Clase II</b> (moderadamente peligrosos)	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000	Malatión
<b>Clase III</b> (poco peligrosos)	2000 a 3000	>4000	500 a 2000	>1000	Glifosato
<b>Clase IV</b> (normalmente no ofrecen peligro)	>3000		>2000		

\*DL<sub>50</sub> es la estimación estadística de la cantidad de una sustancia tóxica (mg/kg) por peso corporal, necesaria para matar al 50% de animales de experimentación en los que se ensaya el efecto letal de una sustancia, administrándola por vía oral o dérmica, durante un tiempo determinado y un periodo de exposición.

Además de la implicación de organismos internacionales en alertar sobre el uso no correcto de estas sustancias, cabe también decir que la industria ha pasado en las últimas décadas a sintetizar sustancias cada vez menos tóxicas y más degradables, menos persistentes, diseñando además equipos de aplicación que supongan menor riesgo para el agricultor, menor riesgo para la salud humana y animal, y que reduzcan la contaminación del medio ambiente, presentando una alta eficiencia y eficacia con relación al coste de la aplicación.<sup>3,4</sup>

El registro de los plaguicidas por parte de la industria en los organismos internacionales debe contener, además de otra información relevante, la descripción de un método de análisis para la identificación y cuantificación de los mismos en alimentos y medio ambiente.

### 3.1 FUNGICIDAS

“Un fungicida es una sustancia, preparación u organismo destinado a destruir o controlar cualquier especie fúngica durante la producción, almacenamiento o distribución de un producto agrícola, alimento o planta ornamental, en situaciones que ponen en peligro la salud de animales o humanos”. Existen una variedad de diferentes compuestos químicos, tanto orgánicos como inorgánicos, que se emplean para su uso como fungicidas.<sup>5</sup>

Así, desde hace siglos se vienen utilizando compuestos inorgánicos como fungicidas, entre otros azufre, cal, cobre y compuestos de mercurio. El azufre constituye un elemento químico muy utilizado en la lucha contra plagas que puede aplicarse en la “agricultura orgánica”. Algunos de los fungicidas metálicos inorgánicos se han retirado del mercado de muchos países debido a su toxicidad y efectos ambientales.<sup>6</sup> Otras sustancias empleadas como fungicidas son de naturaleza orgánica, así el clorotalonil, que se trata de un fungicida halogenado de benzonitrilo y los fungicidas de bencimidazol, benomilo y

carbendazima, que han sido usados desde las últimas décadas del pasado siglo, mientras que otros como las anilopirimidinas, son de síntesis más reciente.<sup>7</sup>

Los fungicidas, al igual que el resto de los plaguicidas, se clasifican en: i) fungicidas foliares que pueden ser sólidos o líquidos que se aplican sobre la planta; ii) fungicidas del suelo de los que asimismo existen líquidos y sólidos como polvos o granulados que se añaden al suelo o al sustrato y iii) fungicidas de apósito útiles en tratamientos pos-cosecha, líquidos o sólidos, muy necesarios en periodos dilatados de almacenamiento en condiciones ambientales de temperatura, humedad y luz desfavorables para la buena conservación de los alimentos.<sup>8</sup>

Su modo de aplicación está relacionado con el efecto pretendido; los foliares se emplean con un fin principalmente curativo o erradicador; los fungicidas del suelo suelen tener un fines protector o erradicador y los fungicidas de apósito pretenden generalmente un objetivo protector.

Es evidente que en razón a lograr un uso eficiente, los fungicidas deben tener ciertas características, entre las que destacan:

- Baja toxicidad para la planta/animal, pero una alta toxicidad para el hongo en particular.
- Capacidad para convertirse en intermedios tóxicos mediante enzimas vegetales o fúngicas.
- Capacidad de penetrar esporas de hongos o el micelio para llegar al sitio de acción.
- Baja ecotoxicidad
- Capacidad para formar un depósito protector y tenaz en la superficie de la planta, resistente a la intemperie de la luz solar, lluvia y viento.<sup>8</sup>

En función de su naturaleza química, la clasificación de los fungicidas se reúne en la **Tabla 2**.

**Tabla 2** – Clasificación de los fungicidas en función de su estructura química.<sup>9</sup>

<b>Familia Química</b>	<b>Ejemplo de Compuestos</b>
<b>Sustituidos halogenadamente</b>	Dicloran, pentaclorofenol
<b>Cloroalquiltiodicarboximidias</b>	Captan, captafol
<b>Anilopirimidinas</b>	Ciprodinil, mepanipirim
<b>Carbamatos y derivados</b>	Tiram, ziram
<b>Benzimidazoles</b>	Benomilo, carbendazim
<b>Conazoles</b>	Ciproconazol, difenoconazol
<b>Morfolines</b>	Dodemorf, tridemorf
<b>Amidas</b>	Metalaxyl, flutolanil
<b>Otros</b>	Thiabendazol, fluodioxonil

Hay que tener presente que tras la cosecha y durante el almacenamiento de los productos los hongos suelen estropear las frutas, verduras o tubérculos almacenados generando grandes pérdidas por enfermedades, por lo que los fungicidas pretenden mejorar la calidad de los mismos durante su producción y almacenamiento, tanto en su aspecto comestible como en su atractivo visual.<sup>10</sup>

Algunos fungicidas, presentan una actividad dirigida contra patógenos específicos, lo cual implica un bajo potencial de toxicidad y otros organismos, siendo un inconveniente que los patógenos desarrollen resistencia al fungicida. Un patógeno resistente es menos sensible a la acción de un fungicida, lo que hace que el mismo sea menos efectivo o incluso llegue a ser ineficaz. Los fungicidas son diseñados para atacar enzimas o proteínas específicas que no dañan el tejido vegetal, pudiendo penetrar y moverse dentro de las hojas, lo que proporciona propiedades curativas y aumenta la cantidad de tejido vegetal producido en el lugar donde se deposita.<sup>11</sup>

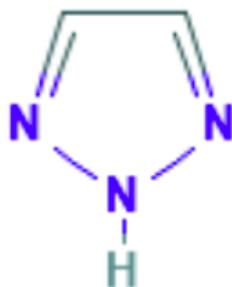
La preocupación actual acerca de los fungicidas se ha derivado de las pruebas de mutagenicidad positivas obtenidas con muchos de ellos y su potencial tanto teratógeno como carcinogénico. Distintos estudios toxicocinéticos proporcionan datos importantes sobre la cantidad de tóxico que llega a un objetivo, así como el metabolismo específico de cada especie. Los animales están expuestos a fungicidas por ingestión o son absorbidos por la piel o el sistema respiratorio y son distintos factores los que regulan su absorción, distribución, metabolismo y excreción. Los fungicidas aril-mercurianos como cloruro de metilo y etilmercurio son de difícil excreción y tienden a acumularse en los músculos, el cerebro u otros tejidos. Mientras que los aril-organomercurianos se excretan más fácilmente y es más difícil que se acumulen en músculos.<sup>12</sup> En general, es el hígado el órgano primario para su biotransformación, incluyéndose reacciones de desintoxicación y activación.<sup>13</sup>

### **3.2 PLAGUICIDA OBJETO DE ESTUDIO**

Los triazoles son una de las principales familias de plaguicidas ampliamente usados en frutas, verduras y cultivos de grano. Son una clase de compuestos heterocíclicos de cinco miembros que contienen un nitrógeno y al menos un segundo átomo que no es de carbono, como por ejemplo nitrógeno, azufre u oxígeno, **Figura 1**.

Forman un grupo emergente de contaminantes que aparecen con frecuencia en el agua.<sup>14,15</sup> Debido a sus características químico-físicas los triazoles son compuestos persistentes en suelo y agua. Este grupo de compuestos presentan una gran variedad de aplicaciones, tales como agentes de deshielo para aviones, detergentes para lavavajillas y también constituyen residuos importantes de muchos fungicidas y medicamentos.

Asimismo, debido a dicha amplia variedad de usos industriales, la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente ha generado preocupaciones sobre su toxicidad potencial hacia procesos biológicos clave en los ecosistemas y en el tratamiento de aguas residuales.



**Figura 1** – Estructura común de los triazoles.<sup>16</sup>

El presente estudio se ha centrado en difenoconazol, **Figura 2**, un compuesto orgánico clorado y perteneciente al grupo de los triazoles siendo su principal uso como fungicida. Presenta actividad curativa pero también preventiva, y se usa ampliamente para el control de enfermedades causadas por todo tipo de hongos patógenos en una gran diversidad de cultivos. Por ejemplo, en China el difenoconazol ha sido el fungicida más usado para combatir las enfermedades asociadas a los cultivos de arroz durante muchos años. Aunque presenta propiedades bacterianas de amplio espectro, su empleo presenta un posible impacto negativo, debido a que su aplicación se centra principalmente en frutas y cereales, teniendo así una mayor oportunidad para contaminar el medio ambiente.<sup>17</sup>

El difenoconazol es un inhibidor sistémico de la desmetilación del esterol, siendo altamente efectivo contra las enfermedades causadas por distintos hongos que afectan a los cereales en la síntesis del ergosterol, al inhibir una enzima fúngica. Es por ello que su uso se encuentra ampliamente extendido en muchos países.<sup>18</sup> Debido a su acción preventiva y curativa, se utiliza para controlar diversas enfermedades de los cultivos causadas por hongos.<sup>19</sup>

Su absorción se lleva a cabo a través de las partes verdes de la planta. El movimiento en el interior de sus hojas y ápices se produce de manera traslaminar.<sup>20</sup> Sus principales usos son como agente foliar y para tratamiento de semillas, contra complejos de enfermedades en viñedos, trigo y hortalizas.

El difenoconazol, al pertenecer al grupo de los triazoles, debido a sus características, anteriormente mencionadas, es un plaguicida con una alta persistencia en suelo y agua. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) ha clasificado el difenoconazol como un fungicida muy potente contra los organismos acuáticos, siendo por lo tanto necesario el estudio toxicológico de este.<sup>21</sup>

Además, el difenoconazol se usa para controlar las enfermedades de los árboles frutales, hortalizas y diversos cultivos alimentarios.

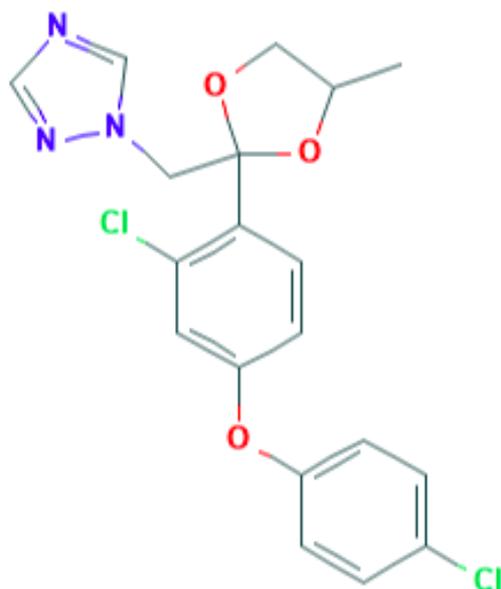


Figura 2 - Estructura química del difenoconazol.<sup>22</sup>

En la **Tabla 3** se reúnen propiedades físico-químicas y toxicológicas del difenoconazol.

**Tabla 3** - Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de difenoconazol.<sup>22,23,24</sup>

Sustancia activa (Nombre común)	Difenoconazol
Nombre químico	1-[2-[2-cloro-4-(4-clorofenoxi)fenilo]-4-metil-1,3-dioxan-2-ilmetil]-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol
Nombre IUPAC	3-cloro-4-[(2 <i>RS</i> ;4 <i>RS</i> ;2 <i>RS</i> ;4 <i>SR</i> )-4-metil-2-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxan-2-ilfenil-4-clorofenil eter
Fórmula molecular	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
Masa molecular (g/mol)	406.3
Aspecto a temperatura y presión de vapor	Solido cristalino
Punto de descomposición (°C)	300
Punto de fusión (°C)	76
Punto de ebullición (°C)	100.8
Solubilidad en agua a 20°C (mg/L)	5
Constante de la Ley de Henry (atmL/mol)	8.9·10 <sup>-12</sup>
Log P	4
Toxicidad	

Los pictogramas de seguridad establecidos para el difenoconazol indican su peligrosidad por toxicidad para la vida acuática, irritabilidad o posible efecto narcótico, además de ser dañino para el medio ambiente. Dicho etiquetado ha sido validado por la Unión Europea.<sup>25</sup>

### **3.3 FORMULADOS DE PLAGUICIDAS**

Según la Ley 43/2002<sup>27</sup> se definen “Formulados de Plaguicidas” como: “las sustancias activas y los preparados que contengan una o más sustancias activas destinados a:

- Proteger los vegetales o productos vegetales contra las plagas o evitar la acción de éstas.
- Mejorar la conservación de los productos vegetales.
- Destruir los vegetales indeseables.
- Influir en el proceso vital de los mismos de forma distinta a como actúan los nutrientes”.<sup>28</sup>

Generalmente dichos “formulados de plaguicidas”, conocidos también como “productos técnicos de fitosanitarios”, consisten en preparados conteniendo la sustancia activa junto con “coformulados” que acompañan al plaguicida, a fin de potenciar su acción para lograr el fin propuesto. Dichos coformulados pueden contener: <sup>29</sup>

- Disolventes, generalmente orgánicos, en el que va disuelta la materia activa
- Tensoactivos, que mejoran la adherencia o interacción materia activa y la planta
- Impurezas, que provienen del proceso de síntesis de la materia activa y que acompañan a ésta en el formulado
- Buffer, que a veces se adicionan a fin de dotar de un pH al medio a fin de favorecer la interacción con el cultivo
- Isómeros, en casos de la materia activa

En todo caso es evidente que un formulado de un plaguicida contiene a la materia activa en un complejo entorno químico-físico, por lo que identificar y cuantificar a la materia activa dista de ser un proceso analítico sencillo, potenciado además por el hecho de que entre todas las clases de compuestos mencionados los hay a niveles muy bajos de concentración, frente a otros que son componentes mayoritarios.

## **3.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DIFENOCONAZOL**

### **3.4.1 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN: MICRO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**

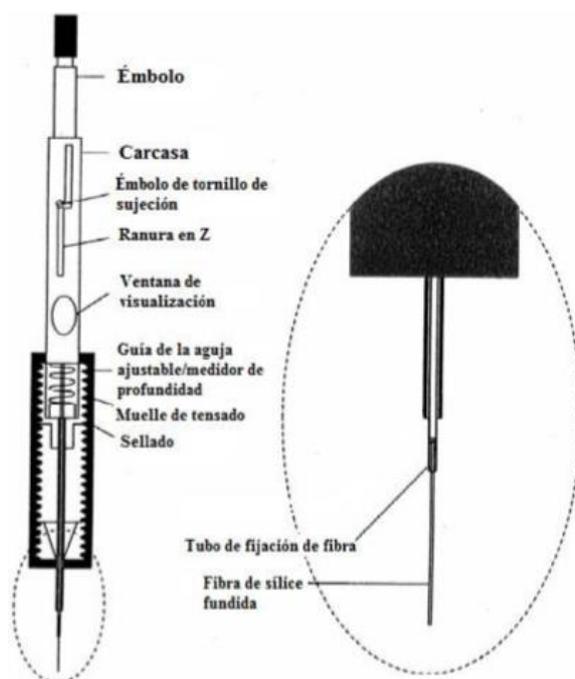
Debido a las bajas concentraciones de los residuos de plaguicidas y de contaminantes orgánicos en muestras alimentarias o ambientales, no es posible determinar la concentración del analito mediante una medida instrumental directa de la disolución que lo contiene, necesitándose habitualmente el uso de una etapa previa a la etapa

instrumental de preconcentración del analito. En el caso de análisis de residuos de plaguicidas la etapa instrumental suele ser una cromatografía, de gases (GC) o de líquidos (LC), en función de la polaridad del compuesto, con un detector fiable, preferentemente de espectrometría de masas (MS). Aparte de lo expresado, la etapa de preconcentración supone asimismo un proceso de aislamiento del analito respecto a la matriz de la muestra, lo que permite abordar la etapa cromatográfica sobre un extracto menos complejo, con menor número de interferencias. En consecuencia son dos los beneficios de dicha etapa: por una parte la preconcentración del analito, el aislamiento de la matriz de la muestra.

Comúnmente, se han usado las técnicas de extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE), esta última caracterizada por su menor uso de disolventes orgánicos, y su facilidad para la semiautomatización mediante acoplamiento “on-line” con la LC. Es desde finales del siglo pasado cuando ha comenzado a usarse la SPME (*Solid Phase Micro-Extraction*) la cual presenta como características principales la disminución de la manipulación de la muestra, reducción del uso de disolventes orgánicos y la capacidad de ser un proceso automatizable con la GC.

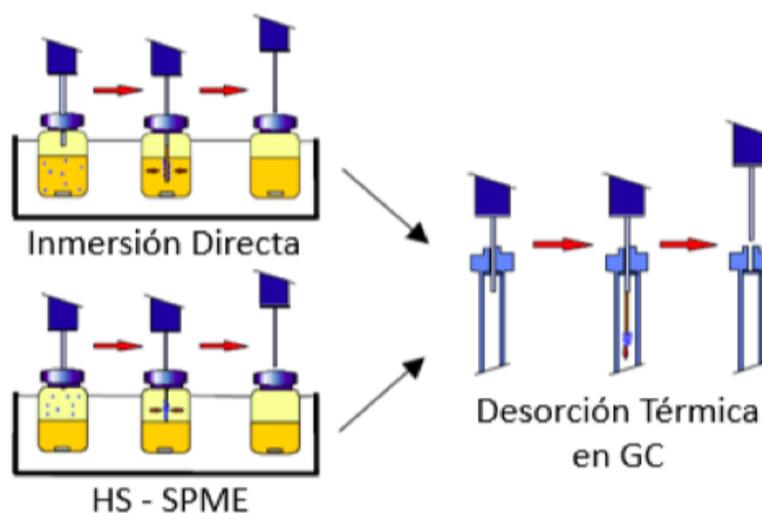
La SPME utiliza una fibra de sílice fundida, con propiedades sorbentes, que permite la sorción de los analitos de interés. A continuación, los analitos retenidos en la fibra se desorben térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, si bien también se puede realizar la desorción en el inyector de un cromatógrafo de líquidos mediante el uso de un disolvente.<sup>33</sup> Los materiales absorbentes más utilizados son polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), poliacrilato (PA) y carboxeno (CAR).<sup>34</sup>

La técnica de SPME se basa en el reparto del analito entre la matriz de la muestra o una disolución que contenga a la misma y el material absorbente. El proceso de extracción desde la muestra líquida o en disolución supone la transferencia de analito entre la muestra y la fibra. Esta, gracias a su forma cilíndrica permite que pueda ser introducida dentro de una jeringa, facilitándose su conservación y manipulación (**Figura 3**).



**Figura 3** – Esquema de un dispositivo comercial de fibra SPME.<sup>35</sup>

La técnica de SPME permite dos modos de extracción, uno de ellos introduciendo la fibra directamente en la muestra, conocido como inmersión directa (DI), o bien el modo en el cual la fibra se introduce en el espacio de cabeza, *head-space* (HS), situado por encima de la disolución que contiene la muestra. Este segundo modo de trabajo es adecuado para la extracción de analitos volátiles. El modo de trabajo HS-SPME presenta la ventaja de protección de la fibra de los compuestos presentes en la matriz que puedan deteriorarla con facilidad, aumentando de esta manera su tiempo de uso, protegiéndola también de interferencias no volátiles o compuestos de elevado peso molecular. En la **Figura 4** se representan esquemáticamente los dos modos de trabajo.



**Figura 4** – Modos de extracción en *SPME-GC* directa y *HS*.<sup>35</sup>

La principal ventaja respecto a las técnicas de extracción y preconcentración clásicas es que se trata de una técnica simple capaz de ser automatizada, que requiere un pequeño volumen de muestra y no precisa del uso de disolventes orgánicos para el proceso, mientras que en LLE y SPE sí se requieren.

Otra de sus ventajas, es que es capaz de ser aplicable a todo tipo de muestras, tanto gaseosas como es el aire, muestras líquidas tales como aguas o muestras sólidas como sedimentos, y aplicable a compuestos de distintas volatilidades.<sup>36</sup>

Acoplada a GC, la técnica permite alcanzar límites de detección muy bajos lo que supone una de sus principales ventajas frente a la SPE y como tal, en combinación con la GC es una de las técnicas más usadas para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en distintas áreas como alimentos o control ambiental.<sup>37</sup>

Si bien aunque el principal uso de la técnica de SPME es la separación y preconcentración de los analitos de interés, en este estudio la técnica ha sido usada asimismo debido a su capacidad para evitar el elevado número de diluciones que hay que llevar a cabo debido a las altas concentraciones de las materias activas en los formulados de plaguicidas, (concentraciones alrededor de unos 500.000 mg/kg). Con ello se permite lograr una disolución que proporcione una señal analítica incluida en la zona de linealidad:

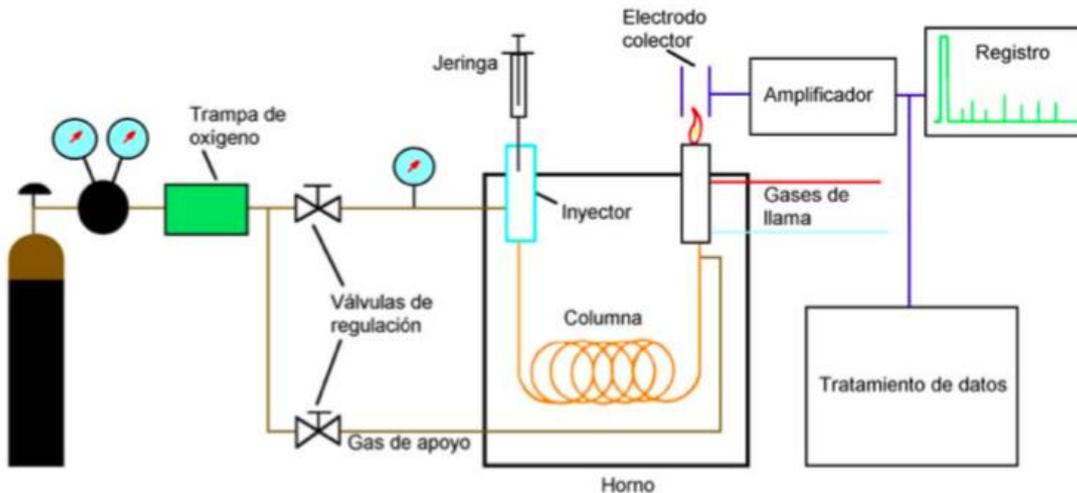
concentración-signal, a la vez que se aprovecha su elevado potencial como técnica selectiva, aislando el analito de interés de numerosos interferentes potenciales.

### 3.4.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS CROMATOGRÁFICAS: CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN

Tras llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre las características del analito de interés, se decidió utilizar para su determinación GC a un analizador de MS de baja resolución, de tipo triple cuadrupolo, ya que se trata de un compuesto de polaridad relativamente baja, acorde para su determinación mediante la citada técnica.

Es conocido que la GC es una técnica ampliamente utilizada en los laboratorios de análisis en la actualidad, pero que ha sido empleada para resolver problemas analíticos desde hace más de 50 años. Entre sus primeras aplicaciones se encuentran el control de las fracciones de petróleo y desde aquel momento no ha cesado de mejorar instrumentalmente y hoy es una de las técnicas analíticas con mayor sensibilidad y elevada capacidad de identificación y cuantificación.<sup>38</sup>

Su empleo está indicado para el análisis de compuestos volátiles o semivolátiles y termoestables, y es capaz de analizar un elevado número de analitos en un solo barrido cromatográfico. En función del tipo de fase estacionaria y móvil usadas se pueden considerar distintas opciones cromatograficas para separar componentes de las muestras objetivo. En la GC, la fase móvil siempre es un gas, mientras que existen fases estacionarias sólidas o líquidas.<sup>24</sup> En la **Figura 5** aparece un esquema general de un cromatógrafo de gases.



**Figura 5** - Distribución general de un cromatógrafo de gases.<sup>40</sup>

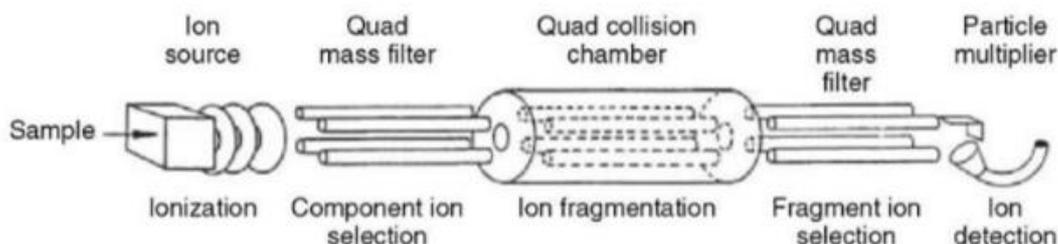
Al cromatógrafo de gases, se le pueden unir diferentes sistemas de detección, partiendo de los sistemas clásicos, usados en el siglo pasado, aunque en análisis especiales todavía son empleados, como es el detector fotométrico de llama. Entre los actuales sistemas de detección el más empleado es el de MS. El detector de MS utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos en función de su relación masa-carga

( $m/z$ ). Por ello, se trata de una técnica analítica gracias a la cual se identifican sustancias químicas separando iones en ambos campos.

Acoplada a la MS, la GC se convierte en una de las técnicas más potentes para la identificación y cuantificación de un amplio rango de compuestos no polares y semipolares. La GC saca partido de la capacidad de la MS para obtener información cualitativa y cuantitativa de los analitos detectados. Una de las principales ventajas de la MS frente al uso de detectores clásicos es que estos últimos requieren un proceso de confirmación de los resultados sospechosos mediante un segundo análisis en un sistema cromatográfico con diferentes columnas cromatográficas y con condiciones instrumentales distintas, lo que supone mucho esfuerzo en el trabajo experimental, que se obvia usando el detector de MS.

Existen distintos analizadores de masas desde los simples cuadrupolos, pasando por los triples cuadrupolos, dentro de la MS de baja resolución hasta llegar a los analizadores de alta resolución (HRMS) como son Orbitrap y el de tiempo de vuelo (TOF) capaces de apreciar más de cuatro cifras decimales de unidades de masa atómica (u.m.a)

En la mayoría de los laboratorios de ensayo y de investigación el GC más utilizado se encuentra acoplado a un sistema de triple cuadrupolo, que consiste en tres cuadrupolos consecutivos, con el segundo cuadrupolo actuando como celda de colisión. La **Figura 6** representa la configuración de un analizador de triple cuadrupolo.



**Figura 6** – Configuración de un analizador de triple cuadrupolo.<sup>41</sup>

Los MS presentan dos modos básicos de trabajo. El conocido como *modo de barrido completo* o *full scan*, en el cual se llevan a cabo barridos de los iones producidos en la fuente de ionización en un rango de  $m/z$  determinado, se obtienen de este modo espectros de masas completos dentro de ese rango. Por otra parte, el modo *monitorización de iones seleccionados* (SIM, *Selected Ion Monitoring*) en este, se fija un voltaje, se seleccionan uno o varios iones del analito y se filtran el resto. Este último modo, presenta una mayor sensibilidad y selectividad, estando indicado su uso para el análisis de compuestos diana, mientras que su principal inconveniente es la pérdida de información estructural frente al modo *full scan*.<sup>42</sup>

En función del tipo de analizador se puede llevar a cabo el ciclo de ruptura-detección de los fragmentos generados, dando lugar a la conocida técnica de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), de este modo se obtiene una mayor información estructural mediante la fragmentación de iones aislados, un aumento de la selectividad y de la sensibilidad para el análisis cuantitativo.<sup>43</sup>

Para llevar a cabo el estudio de difenoconazol en formulados de plaguicidas, el analizador utilizado ha sido el ya mencionado, de triple cuadrupolo, **Figura 6**, el cual ha trabajado en modo *full scan*. La capacidad para seleccionar una única transición específica para el compuesto mejora su especificidad.<sup>42</sup>

### **3.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

La validación de un método es el paso principal a la hora de su desarrollo, ya que permite aportar confianza a los resultados obtenidos. Por ello, se necesita minimizar errores, conseguir resultados reproducibles y fiables, y evitar la obtención de falsos positivos o negativos. Para llevar a cabo la validación se necesita conocer la normativa vigente en torno al método a validar. El proceso de validación puede ser llevado a cabo por un único laboratorio o por un grupo de éstos. Actualmente, existen diferentes organismos internacionales que establecen guías para llevar a cabo el proceso de validación, como son la Guía Sante<sup>44</sup>, la Guía de la Red Europea Eurachem<sup>45</sup> o la Norma ISO 17025.<sup>46,47</sup>

## **4. OBJETIVOS**

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Master es el desarrollo y estudio de un método analítico para la determinación de difenoconazol en formulados de plaguicidas mediante la técnica de SPME, en combinación con GC-MS.

Con la finalidad de alcanzar este objetivo principal se han propuesto tres objetivos secundarios, los dos primeros de ellos se han realizado experimentalmente en laboratorio, mientras que el tercero se ha abordado bibliográficamente dado que quedó interrumpido el acceso al laboratorio debido al confinamiento de la población a causa de la pandemia de COVID-19:

- Optimización de las variables del método instrumental para la caracterización y análisis de difenoconazol mediante GC-MS.
- Optimización de la etapa de extracción mediante el uso de la técnica de HS-SPME de difenoconazol de formulados de plaguicidas.
- Discusión de la validación del método mediante el uso de artículos publicados para el análisis de este mismo compuesto mediante análisis GC-MS, para distintos parámetros característicos como: linealidad, límites de detección y cuantificación, veracidad (expresada en términos de recuperación) y precisión inter-día e intra-día.

## **5. MÉTODOS EXPERIMENTALES**

### **5.1 PATRONES Y REACTIVOS EMPLEADOS**

- Patrón analítico (>99%) de difenoconazol de Sigma-Aldrich (Darmstadt, ALEMANIA)
- Agua Milli Q (Milipore, Bedford, EEUU)
- Metanol (>99%) de Ridel-de-Haën (Madrid, ESPAÑA)
- Score 25 EC (25% p/v de difenoconazol) de Syngenta (Basilea, SUIZA)

- Se ha empleado Helio como fase móvil, tratándose de Helio tipo N50 pureza del 99.9999%

## **5.2 MATERIALES Y EQUIPOS**

- El análisis cromatográfico se llevó a cabo con el uso de un cromatógrafo de gases modelo: Scion GC 320-MS (Bruker Corporation, Fremont, CA, EEUU) con software: MS Workstation Version 7.0 de Bruker Corporation
- Automuestreador Bruker 8400 (Bruker Corporation, Fremont, CA, EEUU)
- Jeringa (10 µL) PAL LIQ. SYRINGE Hamilton Products (Bonaduz, SWITZERLAND).
- Columna cromatográfica VF-5 ms (30 m x 0.25 mm, y 0.25 mm) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU)
- Precolumna (1.5 mm x 0.25 mm) Supelco (Bellefonte, PA, EEUU)
- Espectrómetro de masas Scion MS/MS (QqQ) de Bruker Corporation (Bruker Corporation, Fremont, CA, EEUU) Operando en modo de ionización electrónica (EI, -70 eV)
- Fibras de SPME de poliacrilato (PA) de 85 µm de espesor, fibras de SPME de polidimetilsiloxano (PDMS), fibras de SPME de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), fibras de SPME de polidimetilsiloxano/carboxeno (PDMS/CAR) y fibras de SPME de tres polaridades (DVB/CAR/PDMS) de Supelco (Darmstadt, ALEMANIA)
- Pipetas automáticas de 20-100 µL, 10-1000 µL y 1-5 mL suministradas por Thermo Scientific (Madrid, ESPAÑA)
- Software para el procesado de datos: Bruker Chemical Analysis Workstation 8.0.1 (Bruker Corporation, Fremont, CA, EEUU)
- Viales para cromatografía de 20 mL de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU)
- Vortex de VWR International (Radnor, PA, EEUU)
- Balanza analítica Mettler Toledo (Greifensee, SWITZERLAND)

## **5.3 DISOLUCIONES PATRÓN**

Para llevar a cabo la preparación de la disolución patrón se pesó, con el uso de una balanza analítica, 5 mg de difenoconazol y se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL añadiéndose 10 mL de metanol, obteniendo una disolución madre de concentración 500 mg/L. Otras disoluciones fueron preparadas a partir de diluciones de la anterior.

El patrón de difenoconazol fue conservado en frasco color topacio y cerrado herméticamente para conservarlo en congelador a una temperatura de -20°C. La disolución fue etiquetada indicando la persona que la preparó, la concentración, disolvente empleado y fecha de preparación.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROMÉTRICA**

Se procedió a la caracterización del compuesto mediante la técnica de GC-MS, debido a la baja polaridad del compuesto objeto de estudio. En la **Tabla 4** se reúnen las condiciones espectrométricas optimizadas, mediante uso de una disolución patrón de difenoconazol conteniendo 10 mg/L del compuesto.

**Tabla 4** – Condiciones espectrométricas optimizadas para la determinación de difenoconazol

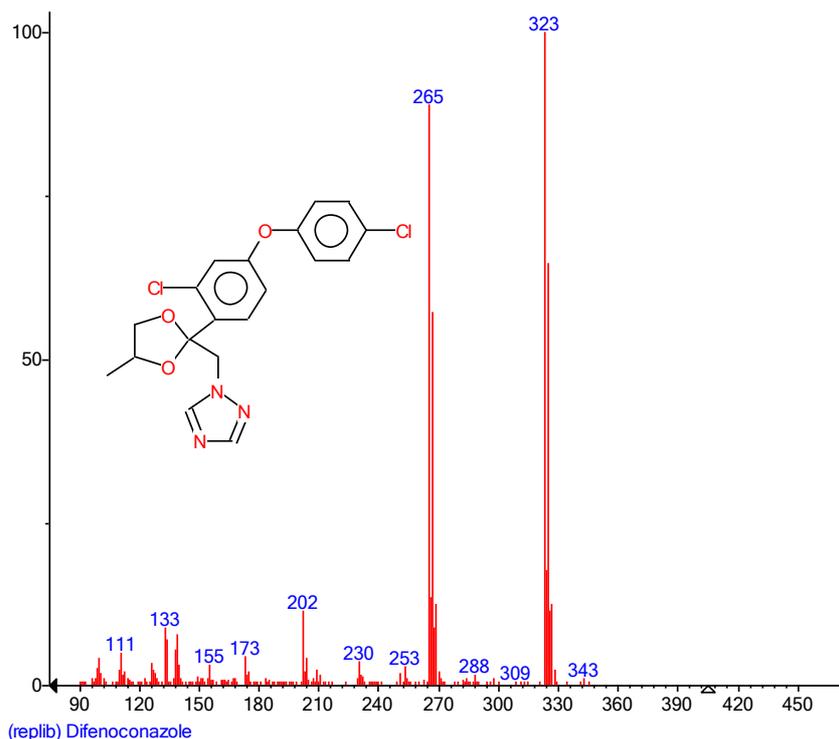
<b>Ionización Electrónica</b>	<b>-70 eV</b>
<b>Temperatura línea de transferencia</b>	280 °C
<b>Temperatura colector</b>	40 °C
<b>Temperatura fuente de ionización</b>	280 °C
<b>Modo de adquisición</b>	MRM
<b>Tiempo de barrido</b>	100 ms
<b>Ventana de tiempo de retención</b>	+/- 3 min
<b>Gas CID</b>	1.5 m Torr de presión
<b>Tiempo apagado inicial MS</b>	6 min

Empleando la disolución patrón y trabajando en modo *full scan* se trató de estudiar la elucidación del compuesto (*quantifier ion*) a partir de los datos espectrales existentes en la base de datos *NIST MS Search*. Se seleccionaron dos fragmentos característicos del compuesto de elevada sensibilidad y selectividad (mayor *m/z* posibles) conocidos como *qualifier ions*.

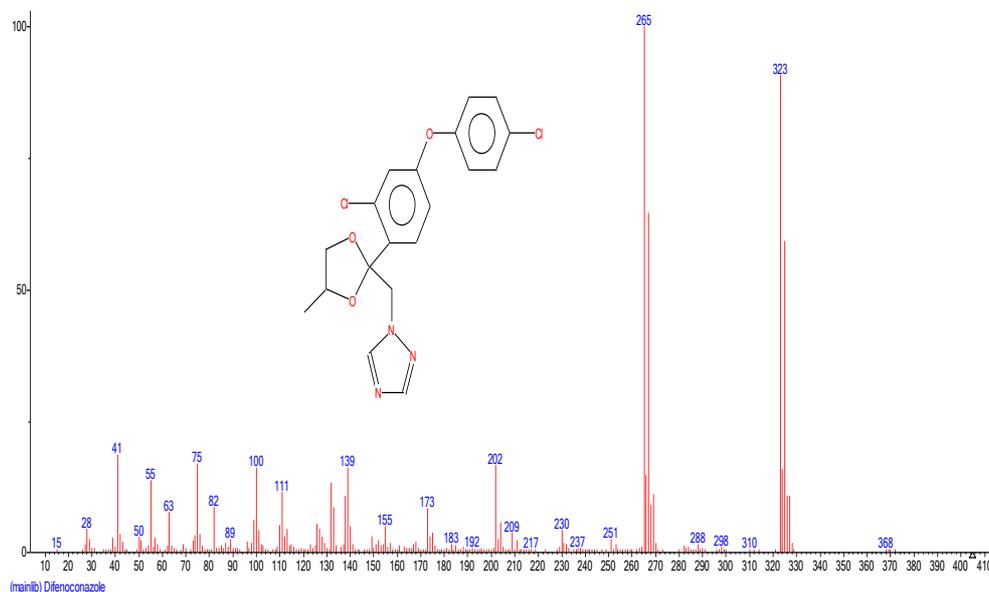
Las condiciones cromatográficas experimentales utilizadas para llevar a cabo su elucidación fueron las siguientes:

- Temperatura del inyector a 250 °C
- Rampa de separación cromatografica empezó a 70 °C (se mantuvo durante 1 minuto), a continuación se calentó hasta 280 °C a una velocidad de 50 °C/min y se aumentó hasta llegar a 295 °C a una velocidad de 2 °C/min manteniéndose esta temperatura durante 5 minutos.
- Voltaje de ionización usado fue 70 eV, condiciones estándares para la técnica de ionización usada: Ionización Electrónica (EI, *Electron Ionization*).

En las **Figuras 7 y 8** pueden observarse los espectros de masas obtenidos experimentalmente para el *cis*-difenoconazol y el espectro que se encuentra en la biblioteca espectral NIST.



**Figura 7** - Espectro de masas del *cis*-difenoconazol obtenido experimentalmente.



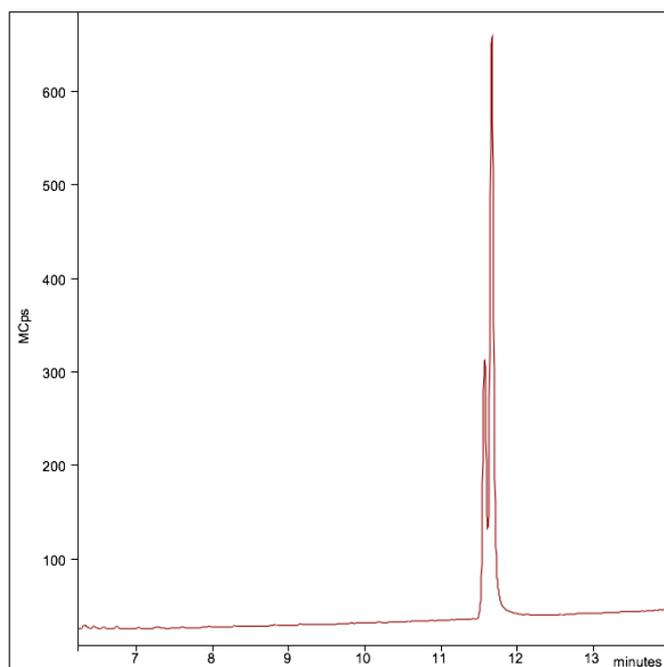
**Figura 8** - Espectro de masas de difenoconazol proporcionado por la biblioteca espectral NIST.

El estudio comparado de ambos espectros de masas establece un ajuste espectral (*match*) de 732, un ajuste espectral inverso (*reverse match*) de 784, y un porcentaje de probabilidad del 92.7%. Los resultados son considerados correctos para la confirmación del compuesto como difenoconazol.

El estudio permite concluir que los iones más abundantes son los que presentan  $m/z$  de 323, 265 y 202 Da. Se propone el uso del ion de  $m/z$  323 como ion cuantificador

(*quantifier ion*) y los otros dos iones, 265 y 202 como iones de confirmación (*qualifier ion*).

En la **Figura 9** puede observarse el cromatograma obtenido para el difenoconazol, mientras que en la **Figura 10** se representa dicho cromatograma ampliado. A la vista del cromatograma obtenido usando las condiciones anteriormente indicadas, se observan dos picos cromatográficos a tiempos de retención 11,6 y 11,7 min, que han logrado ser separados mediante optimización de las condiciones cromatográficas seleccionadas para el horno. A la vista de este cromatograma se concluye que el compuesto seleccionado presenta isomería apareciendo por ello dos picos, correspondientes a los isómeros *cis* (Z) y *trans* (E).



**Figura 9** – Cromatograma experimental obtenido de difenoconazol.

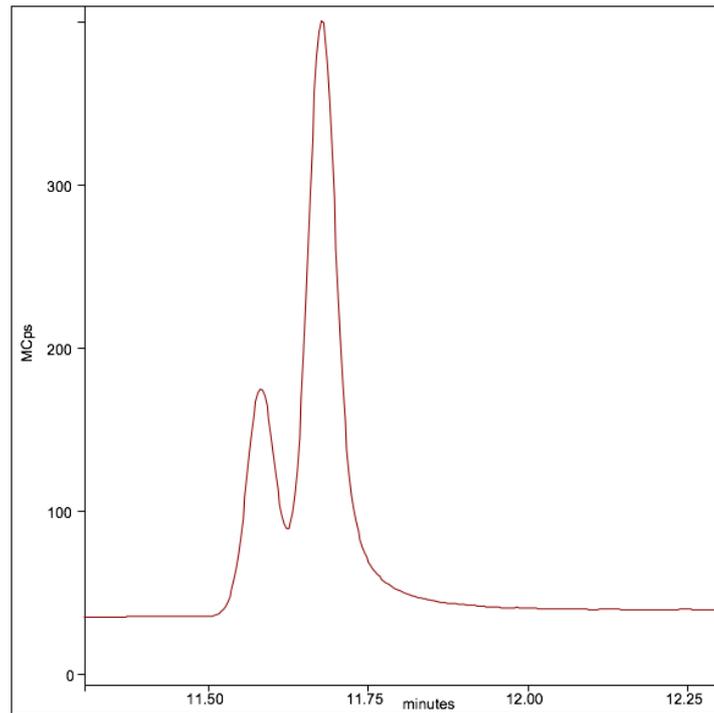


Figura 10 – Ampliación del cromatograma obtenido para difenoconazol.

En las Figuras 11 y 12 se observan los espectros de masas obtenidos en modo *full scan* que resultan ser comunes para los dos isómeros del compuesto. El rango de masas ( $m/z$ ) empleado fue desde 90 a 450 Da.

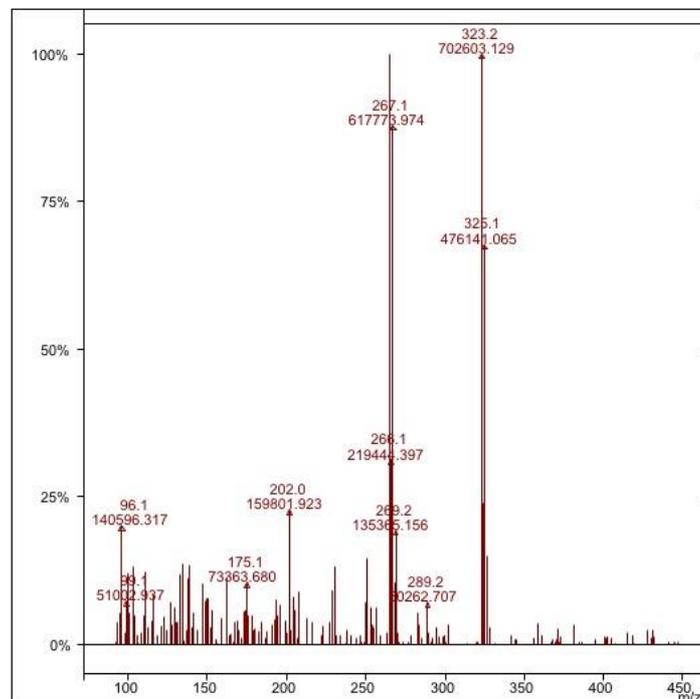
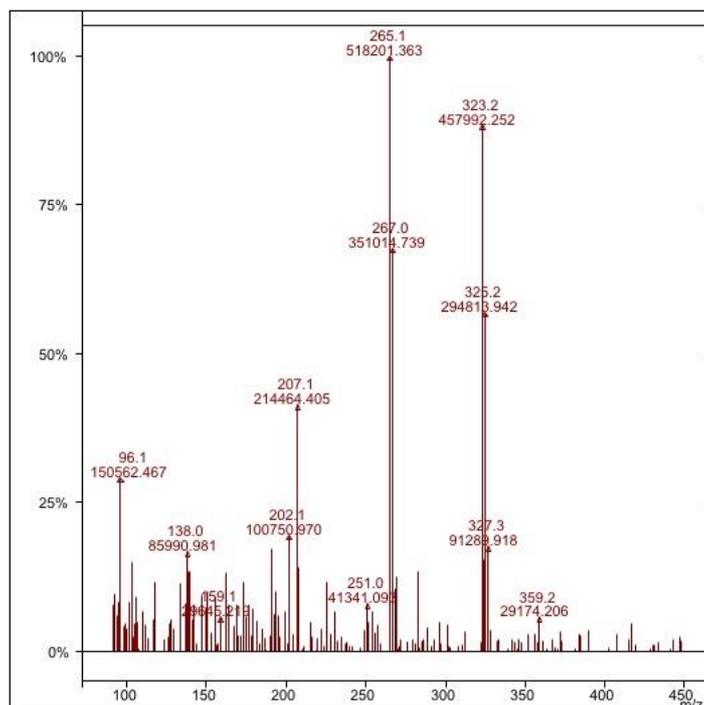


Figura 11 – Espectro de masas en modo *full scan* para *cis* difenoconazol.



**Figura 12** – Espectro de masas en modo *full scan* para *trans* difenoconazol.

Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre los espectros de los dos isómeros del difenoconazol salvo ligeras variaciones en las abundancias relativas de algunos iones. Por lo tanto, el único criterio válido para diferenciarlos es el tiempo de retención de sus correspondientes picos cromatográficos, los cuales, se encuentran suficientemente separados.

Con la información obtenida a partir del espectro de masas teórico de la biblioteca NIST, **Figura 8**, podemos observar la clara aparición del patrón de presencia de cloro en nuestro compuesto, ya que los iones mas importantes presentan una señal menos intensa debido a la diferencia de abundancia entre el  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$ .

## 6.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

### 6.2.1 Estudio del tipo de técnica de SPME

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio del modo de trabajo de SPME que se iba a utilizar en este método. Comúnmente, la técnica de inmersión directa presenta una mayor sensibilidad que la técnica espacio-cabeza, es por ello que suele ser la técnica utilizada para el análisis de muestras limpias ya que no se producen interferencias con el resto de compuestos presentes en la muestra, mientras que la técnica de espacio cabeza se emplea cuando se trata de muestras con elevado grado de contaminación, tratándose de una técnica más limpia.

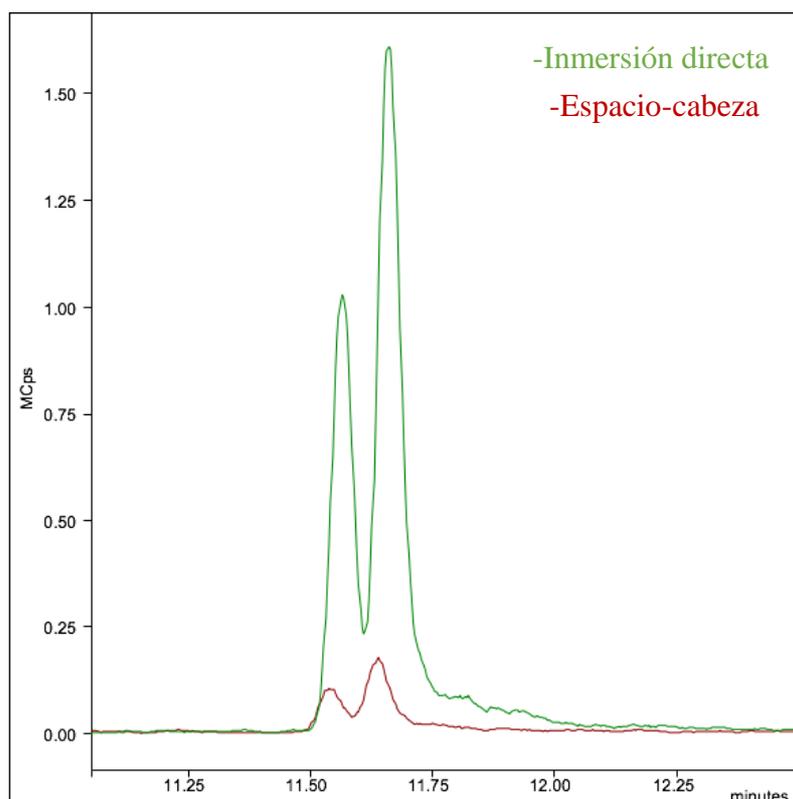
Para el estudio de la modalidad de SPME se realizaron dos experimentos:

1. Por un lado, se llevó a cabo un experimento utilizando el modo de trabajo de inmersión directa, operando sobre una disolución de 20 mL en agua Milli-Q de difenoconazol con una concentración 1 mg/L que se introdujeron en un vial de 20

mL de cromatografía sellado herméticamente. La fibra absorbente penetró en la disolución de patrón.

2. En segundo lugar, para el estudio del modo de trabajo de espacio-cabeza, se preparó una disolución de igual concentración de difenoconazol en agua Milli-Q pero solo se introdujeron 10 mL de la disolución en un vial de 20 mL de cromatografía sellado herméticamente. La fibra absorbente quedó en el espacio existente en el vial por encima de la disolución de patrón.

La **Figura 13** muestra los resultados obtenidos para el estudio de ambas técnicas:



**Figura 13** – Cromatogramas obtenidos para la selección del tipo de técnica de extracción.

A la vista de los resultados se concluye que el difenoconazol es un compuesto susceptible de ser analizado tanto mediante SPME como por HS-SPME. Aunque se obtiene una mayor sensibilidad para la técnica de inmersión directa, la técnica finalmente elegida fue la técnica de espacio-cabeza, ya que al tratarse de formulados de plaguicidas, la concentración a analizar de difenoconazol es muy elevada, por lo que es suficiente con la sensibilidad que proporciona la HS-SPME y presenta la ventaja de que este modo de trabajo reduce la contaminación de la fibra.

### 6.2.2 Estudio del tipo de fibra

Una de las grandes ventajas de la técnica de SPME es la capacidad para utilizar distintos tipos de fibras con distintos recubrimientos, que permiten la optimización de la misma en relación a las características químico-físicas del analito. El difenoconazol presenta un log

$K_{ow}$ , (siendo  $K_{ow}$  la constante de distribución del compuesto entre octanol y agua) medida que representa el carácter poco polar del compuesto, de 4,36.

En el estudio de la influencia de la fibra usada se emplearon cinco fibras de distintas polaridades que se reúnen en la **Tabla 5**, en la que asimismo se relacionan las áreas de pico cromatográfico, la cual representa la suma de los dos isómeros.

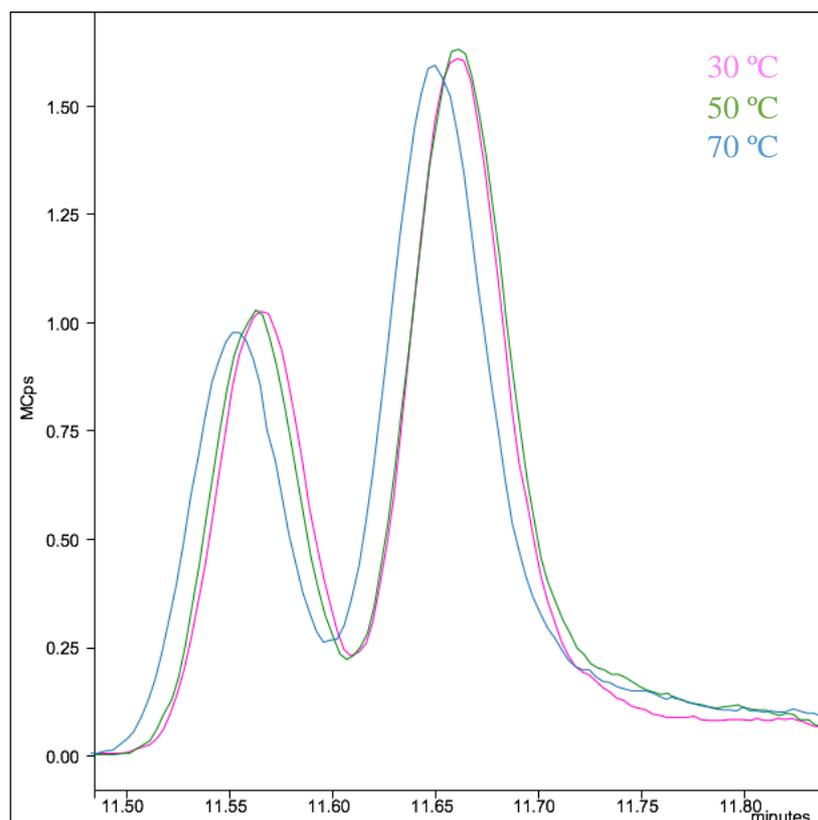
**Tabla 5** – Valores obtenidos para el estudio de las distintas fibras de SPME.

Tipo de fibra	Area (KCps)
Poliacrilato (PA)	585690
Carboxeno/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)	163562
Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)	584578
Polidimetilsiloxano (PDMS)	450607
Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB)	71700

A la vista de los resultados, se observa que no existe una diferencia significativa entre la fibra de PA y la fibra DVB/CAR/PDMS ya que los valores obtenidos fueron prácticamente iguales. Finalmente, fue la fibra de PA la seleccionada para llevar a cabo el estudio de difenoconazol ya que con esta fibra se obtenía una sensibilidad superior a la encontrada con el resto de las fibras.

### 6.2.3 Estudio de la temperatura de incubación de la muestra

A continuación, se llevó a cabo el estudio de la temperatura de incubación de la muestra para el proceso de HS-SPME. Para ello, se utilizó una disolución de 10 mL de 1 mg/L de difenoconazol en 20 mL de agua. Las temperaturas utilizadas fueron 30, 50 y 70 °C.



**Figura 14** – Cromatograma obtenido para el estudio de la temperatura de incubación.

A la vista de los resultados se puede concluir que la sensibilidad encontrada para las temperaturas de incubación de 30 y de 50°C es similar y algo superior a la hallada cuando se opera a 70°C, eligiéndose por ello la temperatura de 30 °C para el desarrollo de siguientes experiencias.

#### 6.2.4 Estudio del tiempo de extracción de la muestra

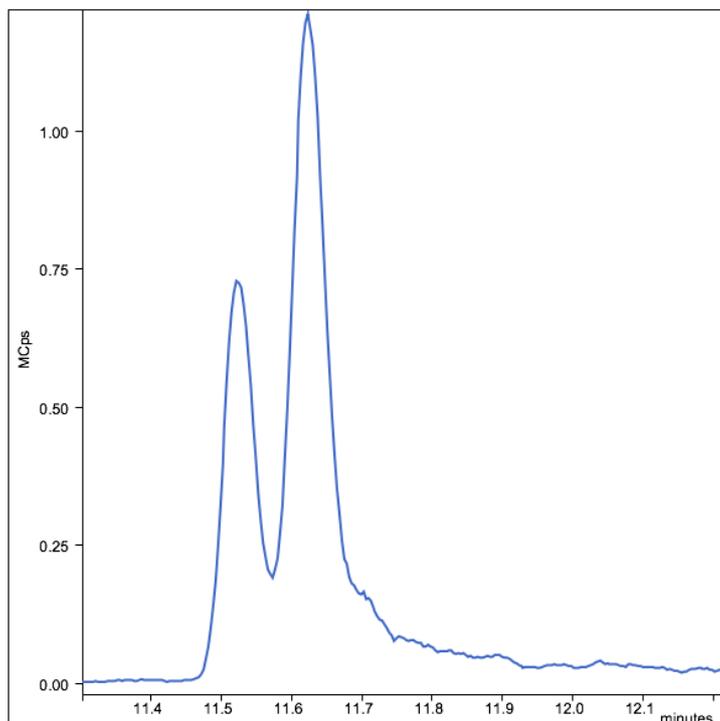
Finalmente, se llevó a cabo el estudio de la influencia del tiempo de extracción. Se conoce como tiempo de extracción al tiempo que se expone la fibra al espacio en cabeza del vial de cromatografía. Este tiempo ha sido estudiado desde los 15 hasta los 75 minutos. Para ello, se ha empleado una disolución de 10 mL de 1 mg/L de difenoconazol en 20 mL de agua. Los valores obtenidos tras el experimento se reúnen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6** – Valores obtenidos para el estudio del tiempo de extracción.

Tiempo de extracción (min)	Área (KCps)
15	$1,104 \cdot 10^7$
30	$1,406 \cdot 10^7$
45	$1,132 \cdot 10^7$
60	$8,443 \cdot 10^6$
70	$8,438 \cdot 10^6$

A la vista de los resultados encontrados puede concluirse que el tiempo de extracción que presentaba una mayor sensibilidad para la detección del compuesto fue de 30 minutos,

por lo que fue seleccionado para sucesivas experiencias. En la Figura 15 se representa un cromatograma obtenido en las condiciones optimizadas de HS-SPME.



**Figura 15** – Cromatograma obtenido condiciones optimizadas de HS-SPME.

### 6.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

La desorción térmica del difenoconazol que ha sido absorbido en la fibra se lleva a cabo en el puerto del inyector cromatográfico. Para llevar a cabo la optimización de esta etapa, se realiza el estudio de la temperatura de desorción, también conocida como temperatura del inyector cromatográfico y el estudio del tiempo de desorción, el cual corresponde al tiempo que se encuentra cerrada la válvula de división del inyector.

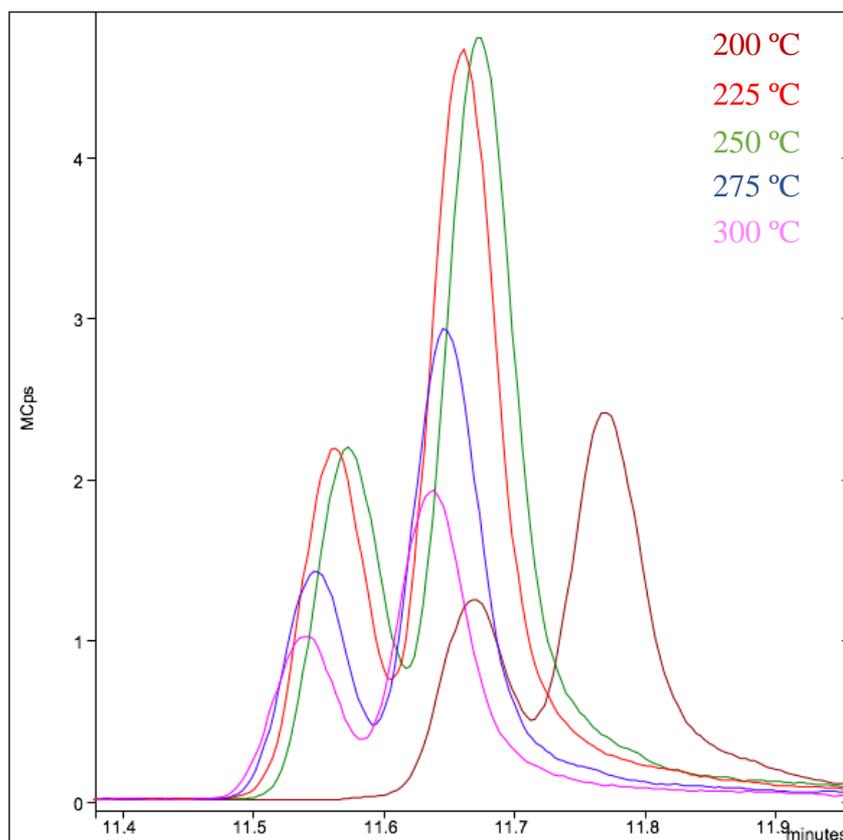
#### 6.3.1 Optimización de la temperatura del inyector

Para comenzar, se llevó a cabo el estudio de la temperatura del inyector. Para ello, se evaluaron temperaturas entre los 200 y 300 °C, utilizándose una muestra de difenoconazol de 1 mg/kg. Los resultados obtenidos se reúnen en la **Tabla 7**.

**Tabla 7** – Resultados obtenidos para el estudio de la temperatura del inyector.

Temperatura (°C)	Área (MCPs)
200	$1,670 \cdot 10^7$
225	$2,783 \cdot 10^7$
250	$2,962 \cdot 10^7$
275	$1,688 \cdot 10^7$
300	$1,238 \cdot 10^7$

En la **Figura 16** pueden observarse los distintos cromatogramas obtenidos para el experimento.



**Figura 16** – Cromatogramas obtenidos para las distintas temperaturas del inyector.

No se probaron temperaturas mayores a 300 °C ya que esta es la temperatura máxima de trabajo de la fibra recomendada por el fabricante.

Se puede observar que los mejores resultados se obtienen cuando la temperatura de desorción es 250 °C, temperatura seleccionada para futuros experimentos.

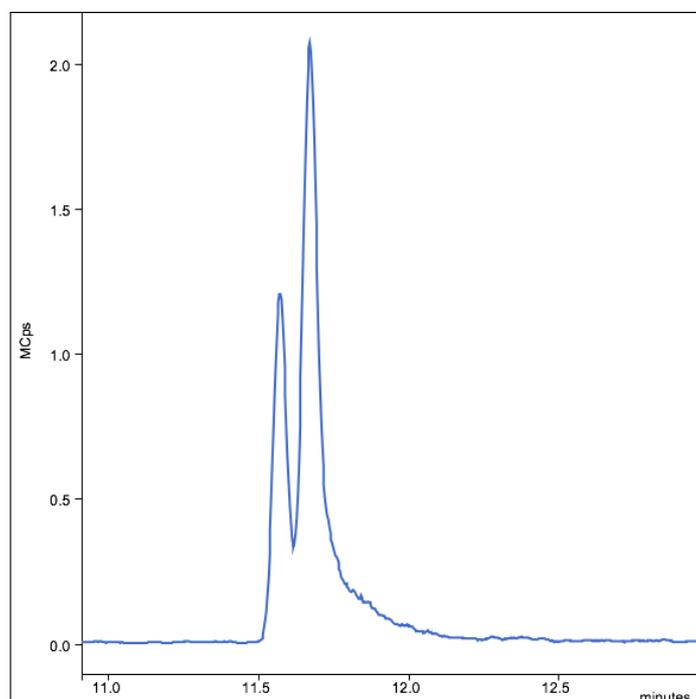
### 6.3.2 Determinación del tiempo de cierre de la válvula del inyector

Finalmente, se llevó a cabo el estudio del tiempo que la válvula de división del inyector debía estar cerrada a fin de transferir el contenido difenoconazol desorbido en el inyector hasta la columna. Para este estudio se emplearon diferentes tiempos de purga de la válvula entre 0.5 y 5.0 min. Los resultados obtenidos se encuentran en la **Tabla 8**. Puede comprobarse que los mejores resultados se encuentran manteniendo 3.0 minutos cerrada la válvula de división del inyector (**Figura 17**).

**Tabla 8** – Valores obtenidos para el estudio del tiempo de cierre de la válvula del inyector

Tiempo de purga (min)	Área (KCps)
0.5	5,095 · 10 <sup>6</sup>
1.0	5,710 · 10 <sup>6</sup>
3.0	6,390 · 10 <sup>6</sup>
4.0	4,951 · 10 <sup>6</sup>
5.0	5,028 · 10 <sup>6</sup>

En consecuencia, durante dicho tiempo el difenoconazol se volatilizó en el inyector a una temperatura de 250°C y así el analito es forzado a migrar a través de la cabeza de la columna cromatográfica, la cual presenta una temperatura inferior a la del inyector. Este transporte está favorecido por el gas portador, el cual transporta al compuesto volatilizado desde el inyector hasta la columna, donde condensa.



**Figura 17** – Cromatograma obtenido para 3 minutos de cierre de la válvula de división del inyector

### 6.3.3 Optimización final de la rampa de temperaturas

La rampa de temperaturas utilizada hasta ahora para el horno cromatográfico fue modificada tras el estudio del tiempo de cierre de la válvula de división del inyector. En principio, la temperatura del horno se mantuvo a 70 °C, modo isoterma durante 1 minuto. Seguidamente, se aumenta la temperatura hasta 280 °C, a una velocidad de 50 °C/min, hasta llegar a 295 °C, a una velocidad de 2 °C. La temperatura de 295 °C, se mantuvo en isoterma durante 5 minutos. Este valor fue mejorado con respecto a los valores de temperatura inicialmente empleados, ya que la isoterma final alcanzaba una temperatura

de 315 °C, y se consiguió optimizar obteniendo la misma separación a la temperatura de 295 °C, de modo que el horno no debía alcanzar una temperatura tan alta y el análisis era más rápido.

#### 6.4 ESTUDIO BIBLIOGRAFICO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANÁLITICO

Una vez que el método ha sido desarrollado experimentalmente, el siguiente paso corresponde a la validación del mismo. Sin embargo, y debido a la situación extraordinaria vivida en España, y en el mundo entero por la COVID-19, este paso no pudo llevarse a cabo en el laboratorio y por ello, ha sido sustituido por una revisión bibliográfica referente al tema. Para ello, se han utilizado 4 artículos realizándose una comparación de los resultados obtenidos en función del método desarrollado y condiciones empleadas. Ya que no existen artículos sobre el estudio de difenoconazol en formulados técnicos, los artículos utilizados estudian este compuesto en otras matrices. Dichos artículos se discuten en términos de parámetros característicos de la validación de métodos, como: selectividad, linealidad, efecto matriz, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), veracidad (expresada en términos de recuperación) y precisión inter-día e intra-día. En los artículos estudiados son el artículo 1 y el 2, los que emplean la técnica de SPME, mientras que el artículo 3 y 4 emplean la técnica de SPE.

Los artículos utilizados han sido los siguientes:

***Artículo 1 - Development and application of a screening method for triazole fungicide determination in liquid and fruit samples using solid-phase microextraction and HPLC-DAD.***<sup>48</sup>

Compuestos estudiados: Difenconazol, Fluquinconazol, Flusilazol, Myclobutanil, Tebuconazol y Tetraconazol

Técnica de análisis: HPLC-DAD (*High Performance Liquid Chromatography- Diode Array Detector*).

Fase estacionaria: PTFE- silicona septa.

Fase móvil: Mix de acetonitrilo y tampón buffer de acetato de sodio (78:22, v/v)

Técnica extracción empleada: Micro extracción en fase sólida.

Tipo de fibra: Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB)

***Artículo 2 - Fast and robust direct immersion solid phase microextraction coupled with gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry method employing a matrix compatible fiber for determination of triazole fungicide in fruits.***<sup>51</sup>

Compuestos estudiados: Triadimefon, Penconazol, Triadimenol, Hexaconazol, Myclobutanil, Flusilazol, Cyproconazol, Diniconazol, Propiconazol y Tebuconazol

Técnica de análisis: GC-ToF-MS. (*Gas Chromatography- Time of Flight Mass Spectrometry*)

Fase estacionaria: Fibra de PDMS

Fase móvil: Helio

Técnica extracción usada: DI-SPME.

Tipo de fibra: PDMS.

**Artículo 3 - Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicide difenoconazole and its main chiral metabolite in vegetables and soil by normal-phase high-performance liquid chromatography.**<sup>49</sup>

Compuestos estudiados: Difenoconazol y sus metabolitos

Técnica de análisis: HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Fase estacionaria: C-18

Fase móvil: *n*-Hexano

Técnica extracción usada: Extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*).

Tipo de sorbente: PSA (Cleanert Pesti-Carb/primary-secondary amine)

**Artículo 4 - Simultaneous enantioselective determination of two new isopropanol-triazole fungicide in plant origin foods using multi-walled carbon nanotubes in reversed-dispersive solid phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.**<sup>50</sup>

Compuestos estudiados: Mefentrifluconazol y Ipfentrifluconazol.

Técnica de análisis: UPLC-MS/MS (*Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*).

Fase móvil: Acetonitrilo – 0.1 % Ácido fórmico.

Técnica extracción usada: Extracción dispersiva en fase sólida reversa (r-DSPE, *Reversed-Dispersive Solid Phase Extraction*)

Tipo de sorbente: nanotubos de carbono de paredes múltiples. (MWCNTs, *Multi-Walled Carbon Nanotubes*)

#### 6.4.1 Selectividad

La *especificidad* de un método indica que el método proporciona una respuesta para un único analito, mientras que, la *selectividad* de un método indica que un método proporciona resultados para una serie de analitos pero con respuestas diferenciadas entre sí.<sup>43</sup>

- En el **artículo 1**, no se estudia dicho parámetro.
- Según el **artículo 2**, la selectividad se estudió usando siete blancos de matriz, de uva y frambuesa, para el desarrollo del método de SPME-GC-MS. Los resultados mostraron que no aparecían interferencias relativas a la identificación y cuantificación de los analitos de interés. Esto se debe por una parte a que los análisis que se llevan a cabo mediante el analizador de MS proporcionan una señal característica del analito y por otra al empleo de la DI-SPME en la etapa de extracción.
- En el **artículo 3**, la selectividad fue evaluada usando blancos de muestra de distintas matrices, pimienta, tomate y suelo. Una vez realizados los análisis, se pudo observar que no aparecían interferencias en los tiempos de retención, concluyéndose que la selectividad del método era buena.
- Según el **artículo 4**, los resultados muestran que no aparecen interferencias en el tiempo de retención de ninguno de los compuestos objeto de estudio, cuando se analiza el compuesto en pimienta y suelo.

A partir de los resultados extraídos de los artículos, podemos destacar que la selectividad del método fue adecuada en las matrices estudiadas, ya que el compuesto objeto de estudio no presentaba interferencias en su tiempo de retención. No obstante cabe resaltar la mayor sensibilidad, entendida como pendiente de la recta de calibrado, del artículo que usa la técnica de SPME, en modo Inmersión Directa.

#### 6.4.2 Linealidad y efecto matriz

La *linealidad* es la capacidad de un método para aportar resultados proporcionales a la concentración de analito. Este parámetro puede ser evaluado de manera gráfica o de manera matemática.<sup>43,44</sup>

- **Artículo 1:** la linealidad se evaluó utilizando  $n \geq 2$  para cada nivel de concentración en matriz (manzanas y uvas), en un rango de concentración de 5,2 a 50,4  $\mu\text{g/L}$  obteniéndose unos valores de  $R_2$  entre 0,9878 y 0,9980.
- **Artículo 2:** la linealidad se evaluó fortificando blancos de las muestras (uvas y frambuesas) a 12 niveles de concentración, desde 0,005 hasta 1000  $\mu\text{g/kg}$ . La recta de calibrado se obtuvo a partir del ajuste de mínimos cuadrados del conjunto de datos correspondientes a las concentraciones del analito patrón y sus correspondientes señales analíticas, estimando así los coeficientes de determinación ( $R_2$ ). Según el método propuesto por este artículo, el método presenta una buena linealidad en todo el intervalo de concentración, con un valor de  $R_2$  de 0.9968 para ambas matrices.
- **Artículo 3:** la linealidad se evaluó utilizando blancos de muestra en los distintos tipos de matrices estudiadas, pepino, tomate y suelo, dentro de unos niveles de concentración de 0,5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ , obteniéndose valores de linealidad para los enantiómeros del difenoconazol ( $R_2 > 0,998$ ).
- **Artículo 4:** la linealidad se evaluó utilizando disoluciones de patrones estándar y en mediante un calibrado en matriz, en el rango de concentración entre 2,5-250  $\mu\text{g/L}$ , se obtuvieron valores satisfactorios de linealidad. ( $R_2 > 0,999$ )

En resumen, la linealidad, fue evaluada en todos los artículos estudiados y en todos ellos se obtenían valores de linealidad adecuados, con valores de  $R_2$  superiores a 0,98.

El *efecto matriz* (*Matrix Effect*, ME) expresa la influencia de otros componentes presentes en la matriz objeto de estudio sobre las señales analíticas de los analitos de interés. Para la cuantificación, se realizan dos rectas de calibrado, una recta de calibrado en disolvente y otra en matriz.<sup>53</sup> La expresión que permite el cálculo del efecto matriz es la siguiente:

$$\text{ME (\%)} = \left( \frac{\text{recta matriz}}{\text{recta disolvente}} - 1 \right) \cdot 100$$

Si el resultado se encuentra entre el  $\pm 20\%$  se considera que el ME no presenta influencia. Para el intervalo  $\pm 20\text{-}50\%$  el ME será moderado y notable cuando ME es superior al  $\pm 50\%$ .

- **Artículo 2**, se estudió el efecto matriz que se produce cuando se usa el detector de diodos array utilizando el método propuesto por estos mismos investigadores en distintas matrices comparando los estándares en disolvente con los valores en matriz. Las pendientes obtenidas en la calibración usando las muestras en matriz fueron comparadas con el difenoconazol en disolvente. De este modo, se pudo observar que no se apreciaba ni supresión ni incremento para el difenoconazol, ya que las ratios de pendientes presentaban valores dentro inferiores al 10%
- **Artículo 3**, de manera general no se observó que haya efecto matriz para el compuesto objeto de estudio, ya que la relación de pendientes fue inferior al 10%.
- Para los **artículos 1 y 4** no se lleva a cabo el estudio del efecto matriz.

#### 6.4.3 Límites de detección y cuantificación

- LOD (*Límite de detección*): Concentración más baja de analito en una muestra que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar.<sup>44</sup>
- LOQ (*Límite de cuantificación*): Concentración más baja de analito en una muestra que puede cuantificarse con una adecuada precisión y exactitud.<sup>44</sup> Según la Guía SANTE se aceptan los siguientes valores:

Precisión, expresada como desviación estándar relativa (RSD)  $\leq 20\%$ ;

Exactitud, expresada en términos de recuperaciones comprendidas entre 70-120 %.

- **Artículo 1**, los límites fueron calculados a partir de 2 g de muestra sólida y realizando las diluciones necesarias. Siguiendo estos pasos, los valores de LODs de referencia para las matrices estudiadas se establecieron en un rango de entre 0,08 (manzanas y uvas) a 0,03 mg/kg (manzanas y uvas). Dichos valores fueron adecuados ya que se encuentran por debajo de su LMR.
- **Artículo 2**, se obtienen excelentes valores de LOQ, en un rango entre 0,25 en uvas y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en frambuesas dependiendo de la matriz en la que se estudie. Además, la sensibilidad del método pudo ser mejorada aumentando el tiempo de extracción, ya que en la técnica de SPME la máxima sensibilidad se obtiene cuando la extracción se realiza en condiciones de equilibrio.
- **Artículo 3**, LOD y LOQ fueron calculados como la concentración que produce una señal con una relación señal/ruido de 3 y de 10, respectivamente. El estudio se llevó a cabo usando cinco replicas y analizando muestras fortificadas a valores de concentración muy bajos (0,2, 0,5 y 1  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Los valores obtenidos para LOD se estimaron entre 0,01 a 0,03  $\mu\text{g}/\text{g}$  para todas las matrices. Mientras que para el LOQ los valores correspondientes a los niveles más bajos de concentración fortificados en todas las matrices se estimaron entre 0,04 y 0,1  $\mu\text{g}/\text{g}$  para todas las matrices.
- **Artículo 4**, se estableció un valor de LOQ de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La Comisión Europea establece que si un plaguicida no tiene un valor regulado de LMR, su valor de MRL se establece en 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .<sup>52</sup> De este modo, se demuestra que este estudio fue efectivo, ya que los

valores de LOQ se encontraron por debajo del valor predeterminado por la UE, demostrándose que el método era por lo tanto válido para la aplicación en dicha matriz.

#### 6.4.4 Precisión

La *precisión* del método (parámetro que proporciona el grado de concordancia entre el conjunto de resultados independientes obtenidos al aplicar el mismo método a una muestra) puede ser evaluada como *precisión intra-día* (también conocida como repetibilidad) o como *precisión inter-día* (conocida como precisión intermedia), ambas se expresan en forma de RSD en tanto por ciento, en función de las condiciones en las que se mide su variabilidad.<sup>45</sup>

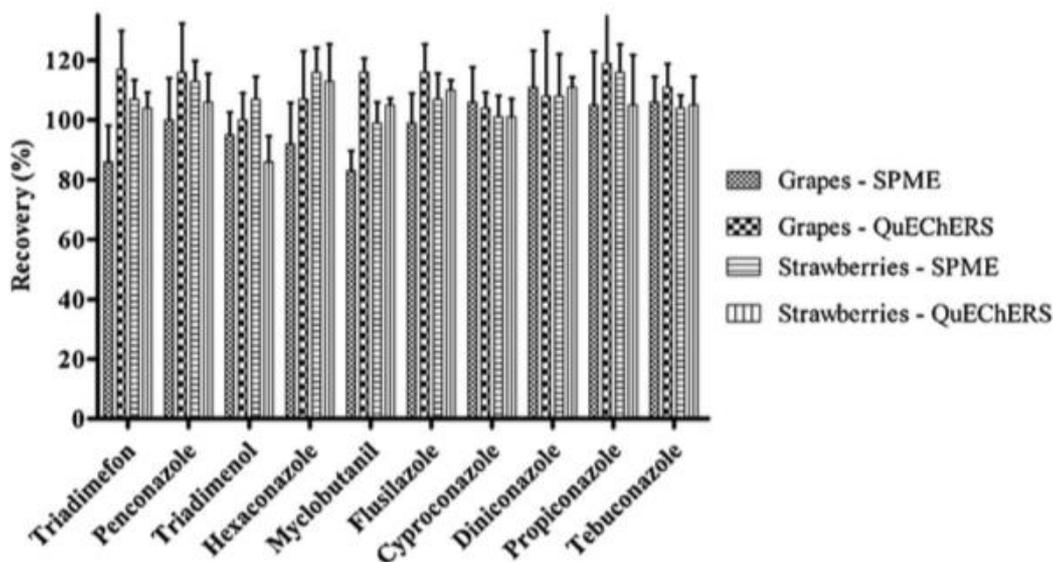
- **Artículo 1**, el método fue evaluado en función de su precisión inter y intra-día, a dos niveles de concentración (15 y 25 µg/L) para cada analito, mediante una calibración externa. Para la precisión intra-día, n=5, y para la precisión inter-día, n=5, fueron utilizadas. Los resultados muestran valores entre 2,8% - 11,5% para la precisión intra-día, mientras que en el caso de la precisión inter-día aparecen valores de entre 5,1% - 13,1%, todos estos resultados obtenidos para las matrices estudiadas, manzanas y uvas.
- **Artículo 2**, la precisión se evaluó usando muestras de blancos fortificados en uvas y frambuesas, con el plaguicida estudiado a diferentes niveles de concentración. Para la precisión intra-día se utilizaron n=5 para cada nivel de concentración, los resultados mostraron valores de RSD menores del 20% y por lo tanto entraban dentro de los valores requeridos según la guía SANCO/12495/2019.<sup>52</sup> La precisión inter-día se evaluó de igual manera, mostrando unos resultados de RSD entre 8 y 20%.
- **Artículo 3**, la precisión fue evaluada a partir de muestras, pepino, tomate y suelo, fortificadas a tres niveles de concentración (0,2 , 0,6 y 1 mg/kg) utilizando n=5 en tres días diferentes. La precisión mostró valores por debajo del 10% para todas las matrices y niveles de concentración. En este artículo solo se estudia la precisión inter-día.
- **Artículo 4**, la precisión se evaluó analizando muestras fortificadas, pepino y suelo, a tres niveles de concentración (0,005, 0,05 y 0,25 µg/kg) con n=5 cada una en tres días diferentes. Se obtuvieron valores de precisión correctos, siendo todos los valores de RSD menores del 6%. La precisión intra-día no fue calculada.

#### 6.4.5 Veracidad

La *veracidad* es definida como la recuperación media del analito a partir de las matrices fortificadas. La guía SANCO/12495/2019<sup>52</sup> establece que la recuperación media es válida dentro de un rango de entre 70 a 120 %.<sup>52</sup>

- **Artículo 1**, la recuperación se evaluó a dos niveles de concentración 15 y 25 µg/L, estas concentraciones se añadieron a muestras fortificadas y a continuación fueron analizadas con el método desarrollado. La media de la recuperación se encontró entre 95 y 108% y la desviación estándar (n=5) entre 0,3 y 11,3%.

• **Artículo 2**, la veracidad fue evaluada mediante valores de concentración estimados, fortificando muestras en blancos de pulpas de uvas y frambuesas, a diferentes niveles de concentración.



**Figura 18** – Recuperaciones para los distintos compuestos objeto de estudio, representando la desviación estándar,  $n=5$ , obtenida usando DI-SPME y el método QuEChERS en uvas (A) y frambuesas (B). Las muestras de frutas estaban fortificadas a  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ .<sup>51</sup>

A la vista del gráfico, se puede ver que con ambas técnicas de extracción se obtienen recuperaciones validas en un rango de 70-120% y  $\text{RSD}_r \leq 20\%$ . Aunque, la principal diferencia entre ambos métodos radica en que los LOQs obtenidos usando DI-SPME eran más bajos que los obtenidos con el método QuEChERS debido al enriquecimiento que aporta dicha técnica.

• **Artículo 3**, la recuperación se evaluó utilizando muestras, pepino, tomate y suelo, fortificadas a distintos niveles de concentración (0,2, 0,5 y 1 mg/kg) con  $n=5$  en tres días diferentes. Los resultados obtenidos presentaron recuperaciones de entre 81.7 (suelo) - 94.5 % (pepino y tomate).

• **Artículo 4**, la recuperación se evaluó analizando muestras fortificadas( pepino y suelo) a tres niveles de concentración (0,005, 0,05 y 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) con  $n=5$  en cada una en tres días diferentes. El método obtuvo buenas recuperaciones expresadas en tanto por ciento, entre 76,9% (pepino) -91,2% (suelo).

Finalmente, se puede concluir diciendo que todos los métodos desarrollados fueron adecuados al fin perseguido ya que se obtuvieron valores de recuperación dentro del valor establecido por la guía SANTE.

## 7. CONCLUSIONES

Después de realizar este estudio, y a pesar de los problemas que se han sufrido debido a la interrupción inesperada del trabajo experimental por el virus COVID-19, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Se ha llevado a cabo el desarrollo de un método analítico para la determinación de difenoconazol mediante GC-MS que permite la separación cromatográfica de los dos isómeros cis- y trans- del mismo. Dicha separación cromatográfica no es total pero suficientemente válida ya que el compuesto debe cuantificarse como suma de ambos isómeros según la legislación vigente en la EU. Además, se pueden diferenciar suficientemente por sus tiempos de retención para su identificación por separado.
- Se ha optimizado un método de extracción sencillo y eficaz mediante HS- SPME que permite el aislamiento del compuesto de un número elevado de potenciales interferencias y que se espera que permita la determinación del compuesto en formulados de plaguicidas a muy elevadas concentraciones sin tener que llevar a cabo numerosas diluciones de la muestra y por lo tanto, disminuyendo la incertidumbre analítica del método. La sensibilidad del método de extracción es menor que cuando se utiliza la versión de DI-SPME pero dicha sensibilidad se adapta mejor a las concentraciones habitualmente presentes en los formulados de plaguicidas objeto de estudio a fin de reducir el número de diluciones necesarias antes de su determinación instrumental al tiempo que se evitan posibles interferentes y contaminación de fibra si se usase el método de ID.
- La validación del método analítico se ha llevado a cabo a través de una revisión bibliográfica relativa al compuesto difenoconazol, mediante uso de diferentes métodos analíticos y aplicado a distintas matrices. En los 4 estudios realizados por otros autores los métodos presentan valores correctos de sus parámetros característicos, si bien el que emplea ID-SPME-GC-ToF obtiene resultados más satisfactorios.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Noviembre 2002
2. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
3. [https://www.insst.es/documents/94886/326801/ntp\\_143.pdf/54a0980e-efd8-4f24-ac14-9471a5409745](https://www.insst.es/documents/94886/326801/ntp_143.pdf/54a0980e-efd8-4f24-ac14-9471a5409745)
4. Guidelines on good practice for ground application of pesticides. FAO, Rome.2001.[texto en: <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/pm/code/guidelines/en/>]
5. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), 2003, 2832-3842
6. Ballantyne, B., 2003. Toxicology of fungicides. In: Marrs, T.C., Ballantyne, B. (Eds.), Pesticide Toxicology and International Regulation. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
7. Ollinger, S.J., Arce, G., Bui, Q., Tobia, A.J., Ravenswaay, B.V., 2010. Dialkyldithiocarbamates (EBDCs). In: Krieger, R. (Ed.), Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, third ed., vol. 2. Elsevier, New York, NY, pp. 16891710.

8. Phillips, S.D., 2001. Fungicides and biocides. In: Sullivan, J.B., Krieger, G.R. (Eds.), *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*, second ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1109-1125.
9. *Reproductive and Developmental Toxicology*, Chapter 39- Herbicides and Fungicides, 2011, 503-521
10. <http://npic.orst.edu/ingred/ptype/fungicide.html>
11. Green, M. B. and D.A. Spilker. 1986. *Fungicide Chemistry: Advances and Practical Applications* (ACS Symposium Series, 304). American Chemical Society. Oxford University Press.
12. *Veterinary Toxicology*, third edition, Basic and Clinical Principles, 2018, 569-580
13. Gupta, P.K., 1986. *Pesticides in the Indian Environment*. Interprint, New Delhi.
14. Alotaibi MD, McKinley AJ, Patterson BM and Reeder AY, Benzotriazoles in the aquatic environment: A review of their occurrence, toxicity, degradation and analysis. *Water Air Soil Pollut* **226**: 226 (2015)
15. Dummer N, 4(5)-Methylbenzotriazole: A review of the life-cycle of an emerging contaminant. *Rev Environ Sci Biotechnol* **13**: 53-61 (2014).
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/67516#section=2D-Structure>
17. Xiyang Mu., Sen Pang., Xingze Sun., Jiejun Gao., Jiayi Chen., Xiaofeng Chen., Xuefeng Li., Chengju Wang. "Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays". *Environmental Pollution* **175**, (2013) 147-157.
18. G. P. Munkvold, "Seed pathology progress in academia and industry," *Annual Review of Phytopathology*, **47**, (2009) 285–311.
19. Munkvold, G.P., Martinson, C.A., Shriver, J.M., Dixon, P.M., 2001. Probabilities for profitable fungicide use against gray leaf spot in hybrid maize. *Phytopathology* **91** (5), 477–484.
20. <https://www.ecured.cu/Difenoconazol>
21. EFSA, C., 2011. Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids). *Sci. Opin. Flavouring Group Eval.* 213.
22. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86173>
23. On 27 September 2011 the Standing Committee on Food Chain and Animal Health took note of the amendments of chapters 1,3,5, 6 and 7 and appendix II based on the EFSA Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance difenoconazole. *EFSA Journal* 2011; **9**(1): 1967.
24. PPDB: Pesticides Properties DataBase. University of Hertfordshire
25. <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.106.375>
26. Reglamento (CCE) N° 396/22005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/4414/CCEE del Consejo Diario Oficial de la Unión Europea. DO N° L 70 de 16.3.2005,9.1.
27. <https://www.boe.es/buscar/pdf/2002/BOE-A-2002-22649-consolidado.pdf>
28. <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/areas/agricultura/sanidad-vegetal/paginas/productos-fitosanitarios.html>
29. <https://www.probelte.es/noticia/es/-que-son-los-productos-fitosanitarios-y-para-que-se-utilizan/13>
30. [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/legislacion/RD%20506-2013\\_tcm30-72952.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/legislacion/RD%20506-2013_tcm30-72952.pdf)

31. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:ES:PDF>
32. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:ES:PDF>
33. Cela R., Lorenzo R., Cassais M. Técnicas de separación en Química Analítica. Ed.Sintesis. (2002) 8, 295-297
34. Chammui Y., “Rapid Analyssis of some endocrine disruptor chemicals leaching from baby milk feeding bottles using SPME and SDME techniques”. Food Analytical Methods. (2017) 10, 2607-2618
35. Lord, H., & Pawliszyn, J. “Evolution of solid-phase microextraction technology”. *Journal of Chromatography A*. (2000) 885, 153–193.
36. R.A. Dong., S.M. Chang., Y.C. Sun., *J.Chromatogr. Sci.* (2000)38, 528
37. M. Knutson, F. Viteri; *Analytical Biochemistry*. (1996) 242, 129-135.
38. Rouessac F.; Rouessac A. “*Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*”. Mc Graw Hill. (2003) 165.
39. Skoog, D.A., Holler, F.J, Crouch, S.R., “*Principios de análisis instrumental*” Cengage Learning Editores, Mexico D.F., (2008) 356.
40. [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigación/cromatografia/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigación/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf)
41. Picó, Y.; Blasco, C.; Font G. “*Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview*”. *Mass Spectrometry Reviews*. (2004) 23, 45-85.
42. Hoffmann E.; Stroobant V.; “*Mass Spectrometry. Principles and Applications*” 2<sup>nd</sup> Edition. Jonh Wiley & Sons. England. (2002)
43. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/111945/22015.Supersedes SANCO/112571/22013. Implemented by 01/001/22016.EUROPEAN COMISSION.
44. “V. Barwick (Ed), *Eurachem/CCITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry*”: An Aid to Accreditation (33<sup>rd</sup> ed. **2016**). Available from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
45. ISO, International Organization for Standarization (ISO/EIC 17025:2017, **2017**, General requirement for the competence of testing and calibration laboratories.
46. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, adopted in 1996, Geneva
47. Bordagaray, A., García-Arrona, R., & Millán, E. (2013). Development and application of a screening method for triazole fungicide determination in liquid and fruit samples using solid-phase microextraction and HPLC-DAD. *Analytical Methods*, 5(10), 2565. doi: 10.1039/c3ay26433e
48. Li, J., Dong, F., Cheng, Y., Liu, X., Xu, J., & Li, Y. et al. (2012). Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicide difenoconazole and its main chiral metabolite in vegetables and soil by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 404(6-7), 2017-2031. doi: 10.1007/s00216-012-6240-z
49. Li, J., Dong, C., An, W., Zhang, Y., Zhao, Q., Li, Z., & Jiao, B. (2020). Simultaneous Enantioselective Determination of Two New Isopropanol-Triazole Fungicides in Plant-Origin Foods Using Multiwalled Carbon Nanotubes in Reversed-Dispersive Solid-Phase Extraction and Ultrahigh-Performance Liquid

- Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 68(21), 5969-5979. doi: 10.1021/acs.jafc.0c01385
50. Silva, É., Lopez-Avila, V., & Pawliszyn, J. (2013). Fast and robust direct immersion solid phase microextraction coupled with gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry method employing a matrix compatible fiber for determination of triazole fungicides in fruits. *Journal Of Chromatography A*, 1313, 139-146. doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.071
  51. *European Commission*. 2008. *New rules on pesticide residues in food*. Available at: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_legis\\_factsheet\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_legis_factsheet_en.pdf)
  52. [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance\\_SANTE\\_2019\\_12682.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf)

## 9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **CAR.** *Carboxen*. Carboxeno.
- **CID.** *Collision Induced Dissociation*.
- **DAD.** *Diodo Array Detection*. Detección Diodo Array.
- **DI-SPME.** *DirectImmersion Solid-Phase Microextraction*. Microextracción en fase sólida en inmersión directa.
- **DVB/CAR/PDMS.** *Divynilbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane*. Divilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano.
- **ECPA.** *European Crop Protection Association*. Asociación europea para la protección de las plantas.
- **EFSA.** *European Food Safety Authority*. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
- **EI.** *Electron Ionization*. Ionización Electrónica.
- **EM.** *Matrix Effect*. Efecto matriz.
- **EU.** *European Union*. Unión Europea.
- **eV.** Electronvoltio.
- **FAO.** *Food and Agriculture Organization*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- **GC.** *Gas Chromatography*. Cromatografía de gases.
- **GC-MS.** *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- **HPLC.** *High Performance Liquid Chromatography*. Cromatografía de líquidos de alta resolución.
- **HRMS.** *High Resolution Mass Spectrometry*. Espectrometría de masas de alta resolución.
- **HS-SPME.** *HeadSpace Solid-Phase MicroExtraction*. Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza.
- **ISO.** *International Organization for Standardization*. Organización internacional para la estandarización.
- **LC.** *Liquid Chromatography*. Cromatografía de líquidos.
- **LMR.** Límite Máximo de Residuo.
- **LOD.** *Limit of Detection*. Límite de detección.
- **LOQ.** *Limit of Quantification*. Límite de cuantificación.
- **MRM.** *Multiple Reaction Monitoring*.
- **MRL.** *Maximum Residue Limit*. Límite máximo de residuo.
- **MS.** *Mass Spectrometry*. Espectrometría de masas.
- **MS/MS.** *Tandem Mass Spectrometry*. Espectrometría de masas en tándem.
- **m/z.** Relación masa/carga.
- **NIST.** *National Institute of Standards and Technology*. Instituto Nacional de Estándares y Tecnología.
- **OMS.** Organización Mundial de la Salud.
- **PA.** *Poliacrilate*. Poliacrilato.
- **PDMS.** *Polydimethylsiloxane*. Polidimetilsiloxano.
- **PDMS/DVB.** *Polidimethylsiloxane/Divynilbenzene*. Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno.
- **QqQ.** *Triple quadrupole*. Triple cuadrupolo.
- **Q-TOF.** Analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo.
- **TOF.** *Time of Flight*. Tiempo de vuelo.
- **R<sub>z</sub>.** Coeficiente de determinación.

- **RSD.** *Relative Standard Deviation.* Desviación estándar relativa.
- **SANTE.** Acrónimo del francés Santé Consumers.
- **SIM.** *Single Ion Monitoring.*
- **SRM.** *Simple Reaction Monitoring.*
- **TOF.** *Time-of-flight.* Tiempo de vuelo.
- **UPLC.** *Ultra High-Performance Liquid Chromatography.* Cromatografía de líquidos de alta eficacia.

## 10. ANEXOS

### 10.1 ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1** – Estructura común de los triazoles.

**Figura 2** – Estructura química del difenoconazol.

**Figura 3** – Esquema de un dispositivo comercial de fibra SPME.

**Figura 4** – Modos de extracción en *SPME-GC* directa y *HS*.

**Figura 5** - Distribución general de un cromatógrafo de gases.

**Figura 6** – Configuración de un analizador de triple cuadrupolo.

**Figura 7** - Espectro de masas del *cis*-difenoconazol obtenido experimentalmente.

**Figura 8** - Espectro de masas de difenoconazol proporcionado por la biblioteca espectral NIST.

**Figura 9** – Cromatograma obtenido de difenoconazol.

**Figura 10** – Ampliación del cromatograma obtenido para difenoconazol.

**Figura 11** – Espectro de masas en modo *full scan* para *cis* difenoconazol.

**Figura 12** – Espectro de masas en modo *full scan* para *trans* difenoconazol.

**Figura 13** – Cromatogramas obtenidos para la selección del tipo de técnica de extracción.

**Figura 14** – Cromatograma obtenido para el estudio de la temperatura de incubación

**Figura 15** – Cromatograma obtenido extrayendo 30 min la muestra.

**Figura 16** – Cromatogramas obtenidos para las distintas temperaturas del inyector.

**Figura 17** – Cromatograma obtenido para 3 minutos de apertura de la válvula de división del inyector.

**Figura 18** – Recuperaciones para los distintos compuestos objeto de estudio, representando la desviación estándar,  $n=5$ , obtenida usando DI-SPME y el método QuEChERS en uvas (A) y frambuesas (B). Las muestras de frutas estaban fortificadas a  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

## **10.2 ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1** – Clasificación toxicológica de plaguicidas según la OMS.

**Tabla 2** – Clasificación de los fungicidas en función de su estructura química.

**Tabla 3** - Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de difenoconazol.

**Tabla 4** – Condiciones espectrométricas utilizadas para la determinación de difenoconazol.

**Tabla 5** – Valores obtenidos para el estudio de las distintas fibras de SPME.

**Tabla 6** – Valores obtenidos para el estudio del tiempo de extracción.

**Tabla 7** – Resultados obtenidos para el estudio de la temperatura del inyector.

**Tabla 8** – Valores obtenidos para el estudio del tiempo de cierre de la válvula del inyector.